

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS

Alice de Carvalho Dalfolo

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO  
DE BIOFILMES ATIVOS  
COM EXTRATO DE BAGAÇO DE OLIVA**

Santa Maria, RS  
2022

**Alice de Carvalho Dalfolo**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES ATIVOS  
COM EXTRATO DE BAGAÇO DE OLIVA**

Dissertação apresentada para o curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

Orientadora: Cláudia Severo da Rosa

Santa Maria, RS  
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance Code 001

DALFOLO, Alice de Carvalho  
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES ATIVOS  
COM EXTRATO DE BAGAÇO DE OLIVA / ALICE DE CARVALHO  
DALFOLO.- 2022.  
64 p.; 30 cm

Orientadora: Claudia Severo da Rosa  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2022

1. Biofilmes ativos com extrato de bagaço de oliva 2. Utilização de resíduos agroindustriais 3. Biofilmes biodegradáveis 4. Caracterização de biofilmes ativos I. Severo da Rosa, Claudia II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo(a) autor(a) sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, ALICE DE CARVALHO DALFOLO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias, objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Alice de Carvalho Dalfolo**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES ATIVOS  
COM EXTRATO DE BAGAÇO DE OLIVA**

Dissertação apresentada para o curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Aprovada em 11 de fevereiro de 2022

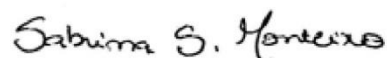


Dra. Cláudia Severo da Rosa (UFSM)  
(Presidente/ Orientadora)



---

Dra. Marcia Regina de Moura Aouada (UNESP)



---

Dra. Sabrina Sauthier Monteiro (UFSM)

Santa Maria, RS

2022

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Saulo e Giovana, que sempre me apoiaram e me incentivaram nas minhas escolhas, e sem esse apoio nada seria possível, meu eterno obrigado! Amo vocês.

A minha irmã Luíza, sempre disposta a me ouvir e aconselhar, isso foi muito importante para conseguir continuar e não desistir.

Ao meu namorado Maico, que sempre esteve presente, me incentivando em todos os momentos.

Agradeço imensamente aos meus familiares e amigos, vocês também fazem parte dessa história.

A minha orientadora Claudia Rosa, por sempre estar disponível em todos os momentos para orientação, sempre disposta a ajudar, me dando oportunidade de crescer cada dia mais. Muito obrigada por tudo que me ensinou.

A minha colega e amiga Pamela, iniciamos juntas essa etapa de nossas vidas e com o teu apoio e tua ajuda tudo se tornou mais leve. Obrigada por todo companheirismo durante essa pesquisa.

A equipe do Laboratório, que em todas as vezes que precisei de auxílio, me ajudou.

As minhas colegas Caroline, Jamila e Camila, que não mediram esforços para ajudar e passar o seus conhecimentos.

As professoras integrantes da banca, Dra. Marcia Regina de Moura Aouada e Dra. Sabrina Sauthier Monteiro, pelas considerações e sugestões essenciais para essa dissertação.

A CAPES pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta neste estudo.

Obrigada.

## RESUMO

### DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES ATIVOS COM EXTRATO DE BAGAÇO DE OLIVA

AUTORA: Alice de Carvalho Dalfolo  
ORIENTADORA: Cláudia Severo da Rosa

Os compostos bioativos têm sido reconhecidos por suas propriedades antimicrobiana e antioxidante, ganhando destaque na indústria de alimentos para ser utilizado como aditivo natural. Neste sentido, a incorporação de compostos bioativos em filmes comestíveis é uma alternativa, permitindo a obtenção de embalagens ativas que auxiliam na conservação de alimentos. O objetivo do trabalho foi extrair compostos bioativos do bagaço de oliva por dois métodos (convencional e ultrassom) e aplicar o melhor extrato de cada método no desenvolvimento de um biofilme. Para isso, foi aplicado um planejamento fatorial de 22 com triplicata no ponto central para otimizar a concentração alcoólica e o tempo de extração dos dois métodos. Foram realizadas análises de fenólicos pelo método de Folin nos extratos e filmes e atividade antioxidante pelo método de DPPH nos filmes e caracterização dos biofilmes. Os filmes foram elaborados com quitosana e gelatina (50/50v) sendo eles (controle, extração convencional com 5% de extrato (FEC 60%) e extração por ultrassom com 5% de extrato (FEU 80%)). O extrato otimizado pelo método convencional foi com extração alcoólica a 60% e apresentou (462,91mg/g de amostra seca) de fenólicos e o outro foi o método de ultrassom com extração alcoólica a 80% com (524,00mg/g de amostra seca). Os filmes apresentaram, controle (115,01mg/g amostra seca), o método convencional com extração alcoólica a 60% (146,25mg/g amostra seca) e o método de ultrassom com extração alcoólica de 80% (179,58 mg/g de amostra seca) de fenólicos, a atividade antioxidante foi de 2,83%, 64,16% e 78,45%, respectivamente nos filmes. Além disso, os filmes obtidos foram avaliados quanto à análise de propriedades mecânicas, ângulo de contato, permeabilidade ao vapor de água, solubilidade, cor, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), opacidade e biodegradabilidade. Verificou-se que os filmes contendo a incorporação do extrato de bagaço de oliva não tiveram interferência na sua espessura. A opacidade dos biofilmes ativos foi superior ao do controle devido ao ângulo de contato maior que 65°, para todos os filmes, apresentaram características hidrofóbicas. Os biofilmes ativos demonstraram que a incorporação do extrato aumentou consideravelmente as propriedades bioativas e antioxidantes. Dessa forma, foram elaborados biofilmes ativos com bagaço de oliva, que podem ser usados na conservação de alimentos, demonstrando ser uma pesquisa promissora para área.

**Palavras-chave:** Compostos fenólicos. Ângulo de contato. Resíduo agro-industrial. Bagaço de azeitona. FTIR.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF ACTIVE BIOFILMS WITH OLIVE BASKET EXTRACT

AUTHOR: Alice de Carvalho Dalfolo

ADVISOR: Cláudia Severo da Rosa

Bioactive compounds have been recognized for their antimicrobial and antioxidant properties, gaining prominence in the food industry to be used as a natural additive. In this sense, the incorporation of bioactive compounds in edible films is an alternative, allowing the achievement of active packaging that helps in food conservation. The objective of this work was to extract bioactive compounds from olive pomace by two methods (conventional and ultrasound) and apply the best extract of each method in the development of a biofilm. For this, a factorial design of  $2^2$  was applied in triplicate at the central point to optimize the alcohol concentration and the extraction time of the two methods. Phenolic analyzes were performed by the Folin method in the extracts and films and antioxidant activity by the DPPH method in the films and characterization of biofilms. The films were prepared with chitosan and gelatin (50/50v) and they were (control, conventional extraction with 5% extract (FEC 60%) and ultrasonic extraction with 5% extract (FEU 80%). The extract optimized by the conventional method was with 60% alcoholic extraction and presented (462.91mg/g of dry sample) of phenolics and the other was the ultrasound method with 80% alcoholic extraction with (524.00mg/g of sample dry). The films presented, control (115.01 mg/g dry sample), the conventional method with 60% alcoholic extraction (146.25 mg/g dry sample) and the ultrasound method with 80% alcoholic extraction (179.58 mg/g of dry sample) of phenolics, the antioxidant activity was 2.83%, 64.16% and 78.45%, respectively in the films. Furthermore, the films were obtained through the analysis of mechanical properties, contact angle, water vapor permeability, solubility, color, Fourier transform infrared spectroscopy, opacity and biodegradability. It was found that the films containing the incorporation of olive pomace extract had no interference in their thickness. The opacity of the active biofilms was superior to that of the control and due to the contact angle greater than  $65^\circ$ , characteristic for all films, with hydrophobic characteristics. The active biofilms demonstrated that the incorporation of the extract considerably increased the bioactive and antioxidant. In this way, active biofilms were prepared with olive pomace, which can be used in food conservation, proving to be a promising research for the area.

**Keywords:** Phenolic compounds. Contact angle. Agro-industrial residue. Olive pomace. FTIR.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1	Estrutura química da quitina ou quitosana .....	21
Figura 2	Esquema das aplicações .....	21
Figura 3	Estrutura do glicerol .....	24
Figura 4	Filme controle, filme com extrato 60% (FEC60%) e filme com extrato 80% (FEU80%), respectivamente .....	30
Figura 5	Padronização dos biofilmes .....	44
Figura 6	Valores do ângulo de contato dos biofilmes ativos (FEC60% e FEU80%) e sem extrato (padrão) .....	46
Figura 7	Espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR) para os filmes controle, FEC60% e FEU80%) .....	48
Figura 8	Teste de degradabilidade com as amostras expostas sobre o solo, controle (P1), FEC60% e FEU80%. Início (dia 0); A) 2 dias; B) 4 dias; C) 6 dias; D) 10 dias; E) 15 dias; F) 20 dias; G) 30 dias; H) 40 dias; I) 50 dias .....	52



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Delineamento experimental 2 <sup>2</sup> para preparação dos extratos para método convencional e ultrassom .....	27
Tabela 2	Compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante (DPPH) dos extratos para o método convencional .....	35
Tabela 3	Compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante (DPPH) dos extratos para o método ultrassom .....	36
Tabela 4	Concentrações inibitórias e letais mínimas para bactérias dos extratos (T2C e T4US) de farinha de bagaço de oliva .....	38
Tabela 5	Concentrações inibitórias e letais mínimas para fungos dos extratos (T2C e T4US) de farinha de bagaço de oliva .....	39
Tabela 6	Compostos fenólicos e atividade antioxidante (DPPH) dos biofilmes produzidos .....	42
Tabela 7	Espessura, solubilidade em água, umidade e permeabilidade ao vapor d'água (PVA) .....	43
Tabela 8	Resistência à tração (MPA) e alongamento na ruptura(%) .....	49
Tabela 9	Cor e opacidade dos filme controle, FEC60% e FEU 80% .....	51

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
3.1 OLIVEIRA .....	14
<b>3.1.1 Bagaço de oliva</b> .....	15
3.2 BIOFILMES .....	16
<b>3.2.1 Composição dos biofilmes</b> .....	17
<b>3.2.2 Gelatina</b> .....	19
<b>3.2.3 Quitosana</b> .....	20
3.3 AGENTE PLASTIFICANTE .....	22
<b>3.3.1 Glicerol</b> .....	23
3.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES .....	24
<b>3.4.1 Espessura</b> .....	24
<b>3.4.2 Solubilidade</b> .....	24
<b>3.4.3 Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)</b> .....	25
<b>3.4.4 Propriedades mecânicas</b> .....	25
<b>3.4.5 Propriedades organolépticas</b> .....	26
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	26
4.1 OBTENÇÃO DO BAGAÇO DE OLIVA .....	26
4.2 PREPARO DA AMOSTRA .....	26
4.3 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS .....	27
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO .....	28
<b>4.4.1 Conteúdo fenólico total</b> .....	28
<b>4.4.2 Atividade antioxidante (DPPH)</b> .....	28
<b>4.4.3 Flavonoides</b> .....	29
<b>4.4.4 Atividade antimicrobiana</b> .....	29
4.5 PRODUÇÃO DOS FILMES COMESTÍVEIS DE GELATINA E QUITOSANA ADICIONADOS DO EXTRATO DE BAGAÇO DE OLIVA ....	29
4.6 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DOS FILMES .....	30
4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES .....	31
<b>4.7.1 Análise Qualitativa</b> .....	31
<b>4.7.2 Espessura</b> .....	31
<b>4.7.3 Umidade</b> .....	31
<b>4.7.4 Solubilidade</b> .....	31
<b>4.7.5 Permeabilidade ao vapor d'água</b> .....	32
<b>4.7.6 Ângulo de contato</b> .....	32
<b>4.7.7 Espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	32
<b>4.7.8 Propriedades de tração</b> .....	33
<b>4.7.9 Cor</b> .....	33
<b>4.7.10 Opacidade</b> .....	33
<b>4.7.11 Degradabilidade</b> .....	33
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	34
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
6.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO .....	34
6.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	37

6.3 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES ATIVOS .....	41
6.4 ESPESSURA, SOLUBILIDADE EM ÁGUA, UMIDADE E PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA DOS FILMES .....	43
<b>6.4.1 Espessura</b> .....	43
<b>6.4.2 Solubilidade em água</b> .....	44
<b>6.4.3 Umidade</b> .....	45
<b>6.4.4 Permeabilidade ao vapor de água</b> .....	45
6.5 ÂNGULO DE CONTATO .....	46
6.6 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .....	47
6.7 PROPRIEDADES MECÂNICAS .....	49
6.8 COR .....	50
6.9 DEGRADABILIDADE .....	51
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	53
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

A embalagem é o recipiente destinado a garantir a conservação, transporte e manuseio dos alimentos. A necessidade de produção em larga escala de embalagens duráveis, para utilização diária no mercado, fez com que os polímeros assumissem um papel de destaque em praticamente todos os segmentos de produção. A produção de materiais plásticos começou a ser produzida em uma escala industrial entre as décadas de 1940 e 1950. Durante os últimos 15 anos, a produção anual global de plásticos duplicou (HAHLADAKIS e LACOVIDOU, 2018).

Atualmente, vários pesquisadores estão focados em projetar embalagens alimentares adequadas que sejam capazes de diminuir as perdas de alimentos e que, ao mesmo tempo, possam reduzir o impacto ambiental geral (DIFONZO et al., 2020). Neste cenário, houve grande interesse na pesquisa e desenvolvimento de materiais de embalagens biodegradáveis com intuito de diminuir o acúmulo de resíduos plásticos no meio ambiente. Uma solução parcial para este problema seria a utilização de um material alternativo na fabricação de embalagens. Devido a seu baixo custo de produção e excelente biodegradabilidade, a quitosana é considerada uma matéria-prima que possui inúmeras aplicações e vantagens, sendo a biodegradabilidade e a não toxicidade suas propriedades mais atrativas para a produção de biofilmes biodegradáveis (THARAHATHAN, 2003).

A quitosana sintetizada pela desacetilação da quitina (poli ( $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-N-acetil-D-glucosamina)), um importante polissacarídeo natural conhecido desde 1884. A quitina é sintetizada por muitos organismos vivos. Pode ser obtido a partir de múltiplas fontes renováveis, principalmente resíduos da indústria do pescado. Assim, a quitosana é um polissacarídeo barato e disponível comercialmente. Na fase sólida, a quitosana é semicristalina e geralmente solúvel em ácido orgânico diluído, como acético, cítrico, fórmico, láctico, málico ou tartárico ácido entre outros (CAZON e VAZQUEZ, 2019). Devido às propriedades mencionadas da quitosana, o interesse em utilizá-la como material para filmes ou revestimentos de embalagens de alimentos está crescendo.

O biofilme constitui uma embalagem primária, pois está diretamente em contato com o alimento. Esse tipo de revestimento ainda não possibilita eliminar o uso de embalagens secundárias e terciárias oriundas de materiais convencionais, mas ainda assim, exerce uma

atuação coadjuvante contribuindo para manutenção da textura e valor nutricional dos alimentos (ASSIS e BRITTO, 2014).

No processamento de azeitonas, para extração do azeite obtém-se grande quantidade de subprodutos, sendo resíduos sólidos ou líquidos, que devem ser tratados ou reaproveitados para prevenir danos ambientais oriundos de seu mau direcionamento (MORE, 2008 apud MEDEIROS et al., 2016). O resíduo sólido obtido através do processo de extração do azeite, denominado bagaço, é composto de polpa, epicarpo dos frutos, partes do caroço triturado e água. Para Freitas (2007), em média, 100 kg de azeitona produzem cerca de 20 kg de azeite; conforme os casos, e em função dos sistemas de extração e produzem aproximadamente 40 kg de bagaço.

Existe clara evidência científica de que os compostos bioativos do bagaço de oliva apresentam propriedades antivirais, antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, e de que se incorporados nos alimentos promovem não só a melhoria da qualidade como podem trazer benefícios para a saúde humana (LEONARDIS et al., 2008; DUARTE, 2011).

De acordo com Medeiros et al. (2016), o hidroxitirosol, 2- (3,4-dihidroxifenil) etanol (HT), é um dos principais e mais interessantes compostos presentes na azeitona, o qual é conhecido pelo alto nível de atividade antioxidante. Esse composto pode ser achado no resíduo na forma livre, de monômeros ou como oleuropeína, actosídeo ou glucosídeo. Conforme Lafka et al. (2011), a utilização de antioxidantes sintéticos promove efeitos indesejáveis à saúde humana, portanto há um interesse em uma fonte natural de antioxidantes. Muitos pesquisadores têm visto no resíduo do beneficiamento do azeite de oliva uma fonte potencial como alternativa desses compostos (MEDEIROS et al., 2016).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- O objetivo desse estudo foi desenvolver biofilme ativo com extrato de bagaço de oliva.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a atividade antioxidante in vitro do extrato da farinha de bagaço de oliva;

- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato da farinha de bagaço de oliva;
- Quantificar o conteúdo total de flavonoides, fenóis totais e atividade antioxidante dos extratos da farinha de bagaço de oliva obtidos pelos métodos, convencional e ultrassom;
- Escolher o melhor extrato do método convencional e do ultrassom para desenvolver biofilmes;
- Caracterizar os biofilmes ativos desenvolvidos.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 OLIVEIRA

A oliveira (*Olea europaea* L.), segundo Oliveira et al. (2012), pertence à família botânica Oleaceae, de porte arbóreo e de clima mediterrâneo. Desenvolve-se bem, mesmo em ambientes com verões longos, quentes e secos, e com baixos índices pluviométricos.

De acordo com Oliveira et al. (2012), as características de solos e climas regionais são fatores importantes para definir as regiões aptas ao cultivo de oliveira no Brasil. Em função das temperaturas baixas, são realizados plantios comerciais nas regiões sul e sudeste do país, especialmente nos estados Minas Gerais e Rio Grande do Sul.

Mello e Pinheiro (2012) pontuam que as variedades mais comuns destinadas a extração do azeite possuem até 80% em ácido oleico (C:18:1;  $\omega$ 9), e quantidades razoáveis de ácidos graxos considerados essenciais: ácido graxo linoleico (C18:2;  $\omega$ 6) e ácido graxo linolênico (C:18:3;  $\omega$ 3). Também estão presentes no azeite de oliva: compostos fenólicos, tocoferóis, vitaminas do complexo B, alguns minerais e antioxidantes naturais.

As diferentes técnicas de extração utilizadas para produção de azeite de oliva, são sendo por: prensa tradicional, filtração seletiva, denominados de sistema contínuo e centrifugação (bifásica e trifásica) denominado sistema descontínuo, conforme Crizel et al. (2018), gera toneladas de bagaço de azeitona em todo o mundo. Devido à sua carga de ácidos orgânicos, compostos fenólicos e lipídios os resíduos da atividade do azeite (bagaço de oliva) apresentam uma questão ambiental séria para os países que o produzem (DERMACHE et al.,

2013). Sendo assim, há a necessidade de garantir a sustentabilidade das atividades produtivas, considerando o equilíbrio entre os pilares econômico, social e ambiental (AGNELLI et al., 2016). Com o aumento da preocupação com o meio ambiente em âmbito mundial, vários estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de buscar possíveis alternativas para a redução da degradação do meio ambiente a partir da minimização na geração de resíduos, bem como do reaproveitamento destes materiais para o desenvolvimento de novas tecnologias. O processamento de resíduos tem como principal objetivo a alteração do produto que anteriormente era descartado em subprodutos com potencial comercial (HASAN et al., 2019).

### **3.1.1 Bagaço de Oliva**

O bagaço de oliva compreende o resíduo sólido gerado a partir da extração do azeite de oliva, dependendo do método de extração utilizado (SPERONI, 2019). Sendo considerada uma fonte importante de compostos fenólicos, apenas 2% desses são transferidos para o azeite, podendo conter mais de 90% retidos no resíduo gerado (SUÁREZ et al., 2009; ALIAKBARIAN et al., 2012).

Esse tipo de resíduo é um dos principais subprodutos do processamento da indústria de alimentos. Sua composição é formada por: polpa, epicarpo dos frutos, partes do caroço triturado e água. Conforme Mirabella, Castellani e Sala (2014), seus principais componentes são açúcares, principalmente na forma de polissacarídeos, ácidos graxos como ácido oleico e outros ácidos graxos C2-C7, poliálcoois, polifenóis e outros pigmentos.

Segundo Dermache et al. (2013), os principais compostos fenólicos encontrados no bagaço de oliva são: ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido vanílico, entre outros, e alguns derivados como: oleuropeína, tyrosol, hydroxytyrosol, luteolina. Além disso, para Galanakis (2011), as azeitonas contêm uma quantidade apreciável de fibra alimentar, enquanto seu conteúdo e sua composição variam entre as variedades. Elas são compostas por polissacarídeos fibrosos: pectina, hemiceluloses, celulose e lignina, representando, em sua maior parte, a fibra insolúvel.

De acordo com Medeiros et al. (2016), o hidroxitirosol, 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol (HT), é um dos principais e mais interessantes compostos presentes na azeitona, o qual é conhecido pelo alto nível de atividade antioxidante. Esse composto pode ser achado no resíduo na forma livre, de monômeros ou como oleuropeína, actosídeo ou glucosídeo. Conforme Lafka et al. (2011), suspeita-se de que a utilização de antioxidantes sintéticos

promova efeitos indesejáveis à saúde humana, portanto há um interesse em uma fonte natural de antioxidantes. Muitos pesquisadores têm visto no resíduo do beneficiamento do azeite de oliva uma fonte potencial como alternativa desses compostos (MEDEIROS et al., 2016).

Existe já clara evidência científica de que os compostos bioativos destas matrizes apresentam propriedades antivirais, antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, e de que se incorporados nos alimentos, promovem não só a melhoria da qualidade como podem trazer benefícios para a saúde humana (LEONARDIS et al., 2008; DUARTE, 2011).

Em estudo realizado por Crizel et al. (2018), avaliou-se o efeito da adição de diferentes concentrações de farinha e micropartículas de bagaço de azeitona em filmes à base de quitosana. Os resultados do trabalho demonstram que foi possível utilizar o bagaço de azeitona no desenvolvimento de filmes de quitosana, mesmo que a incorporação desses resíduos tenha resultado alterações nas propriedades originais dos filmes, permitiu uma melhora significativa das propriedades antioxidantes.

### 3.2 BIOFILMES

O uso de embalagens em alimentos é de extrema importância para a preservação da qualidade do alimento produzido (BRANDEL et al., 2019). As que são constituídas de materiais sintéticos necessitam de um maior período de degradação no meio-ambiente, principalmente quando comparadas com as embalagens constituídas por materiais orgânicos, como, proteínas polissacarídeos e/ou lipídios, que são conhecidos como “biodegradáveis” as quais também são denominadas como biofilme ou filme comestível, constituindo assim uma embalagem alternativa (BATISTA, 2004; DE ARAÚJO e SHIRAI, 2017; JÚNIOR et al., 2020).

Biofilmes são definidos como filmes finos preparados a partir de materiais biológicos derivados de polissacarídeos, proteínas ou lipídios, e permitem a incorporação de substâncias funcionais em sua matriz no intuito de aumentar sua funcionalidade, como o uso de aditivos. Quando usados como embalagem, agem como barreira a elementos externos, como a umidade, óleo e gases, consequentemente, protegem o produto, aumentando a sua vida de prateleira e diminuem a perda de umidade (DIAS, 2008; COSTA et al. 2017; SILVA, 2019). Dessa forma, controlam a respiração do produto e aumentam sua durabilidade (ASSIS, 2009).



Existem dois tipos de aplicação dos biofilmes, como filme ou como revestimento (cobertura), mas a diferença entre eles se dá pelo tipo de formação e não suas matérias-primas (HENRIQUE, PRATI e PARISI, 2016). Os revestimentos envolvem a formação de filmes diretamente na superfície do produto que se deseja proteger ou melhorar de alguma maneira. Neste sentido, os revestimentos tornam-se parte do produto e permanecem nele durante seu uso e consumo. Já os filmes, normalmente, são considerados stand-alone, sendo formados em separado de qualquer eventual utilização pretendida, são uma fina película formada separadamente do alimento e depois aplicada sobre ele (KROCHTA, 2002).

A produção de biofilmes se baseia na formulação de uma solução na qual os materiais biodegradáveis são solubilizados em um solvente como água, etanol ou ácidos orgânicos; conjuntamente com um acréscimo de plastificantes, assim se obtém uma solução homogênea que, ao passar por um processo de aquecimento, resulta em uma solução filmogênica em forma de gel. Com essa solução preparada, os filmes passam por um processo de secagem do solvente. Essa técnica é chamada de casting (ALVES, 2009).

Os filmes começaram a ser utilizados nos séculos XII e XIII na China, quando laranjas e limões foram revestidos por uma camada de cera. No século XVI diversos alimentos começaram a ser recobertos por gordura animal, funcionando assim como uma barreira de proteção à desidratação. O uso dos filmes tem o objetivo de controlar a migração de água de um alimento, a permeabilidade ao oxigênio, dióxido de carbono, a migração lipídica, a fim de manter as qualidades desejáveis em um alimento em relação a cor, sabor, aroma, doçura, acidez e textura, podendo essa camada protetora ser adicionada de aditivos como antioxidantes e antimicrobianos, com a finalidade de retardar a deterioração do alimento (BATISTA, 2004; SIQUEIRA, 2019).

### **3.2.1 Composição dos biofilmes**

Para a produção de uma solução filmogênica é necessário o uso de constituintes básicos como: polímeros de alto peso molecular, denominados agentes formadores (lipídios, proteínas e polissacarídeos), solvente (água e etanol), e/ou agente plastificante (glicerol, sorbitol e triacetina) e agente ajustador de pH. Cada componente traz uma determinada característica para o produto final. A formação dos filmes geralmente envolve associações inter e intramoleculares ou ligações cruzadas de cadeias de polímeros formando uma rede tridimensional semirrígida que retém o solvente. Em relação aos mecanismos de formação, os principais são: precipitação simples, a complexa e a geleificação térmica (BATISTA, 2004;

BERTAN, 2008).

No momento em que uma solução apresentar uma precipitação e sofrer uma alteração de fase, seja por evaporação do solvente, ou pela adição de outro solvente cuja molécula é insolúvel ou por modificação estrutural, o procedimento é chamado de ‘precipitação simples’. A precipitação composta sustenta a ligação de duas soluções de macromoléculas de carga oposta, causando assim uma interação e precipitação do complexo de polímeros. Já na geleificação térmica acontece uma transição sol-gel decorrente do aquecimento de determinadas proteínas, causando assim uma desnaturação e precipitação da mesma, ou ainda causada por resfriamento de uma dispersão de hidrocolóides (BATISTA, 2004). Independentemente do método utilizado na produção, a transformação da solução em filmes ou coberturas são consequência de interações intermoleculares, que se transpõem em forças estruturais (BATISTA, 2004).

São utilizadas diversas fontes para a produção de biofilmes, entre elas: fontes de proteínas (SILVA et al., 2019), polissacarídeos e seus derivados, como: glúten (LUCENA et al., 2017; PALMU, 2003), gelatina (DE SÁ, JR, 2019; OLIVEIRA et al., 2015), isolado proteico de soja (GHORPADE et al., 1995), caseína (CHICK e HERNANDEZ, 2002), celulose (ALMEIDA, 2010; RECOUVREUX, 2004), alginato (GONÇALVES et al 2015; GARCIA- CRUZ, FOGGETTI e SILVA. 2008), pectina (LIMA, 2019; OLIVEIRA et al., 2012), carragena (ALVES et al., 2019), quitosana (OLIVEIRA e NUNES 2011) gelana, entre outros. Fontes de componentes lipídicos que constituem filmes ou coberturas são usadas: ceras, monoglicerídeos e ácidos graxos, geralmente adicionados aos filmes em associação a proteínas ou polissacarídeos (BATISTA, 2004).

Os filmes formados por proteínas e polissacarídeos normalmente apresentam propriedades mecânicas pertinentes a algumas funcionalidades como, permeabilidade seletiva aos gases oxigênio e dióxido de carbono e aos aromas, contudo, não tem uma boa barreira à umidade devido às suas especificidades hidrofílicas, porém podem ser adicionados lipídios (ácidos graxos e ceras) a fim de diminuir a desigualdade das moléculas de água proporcionando assim melhores propriedades de barreira ao vapor de água (FERREIRA, 2006). No entanto filmes desenvolvidos somente com lipídios, possuem atributos de um material hidrofóbico, que é persistente a passagem de água, tornando assim a sua permeabilidade ao vapor de água reduzida, contudo, isso o torna quebradiço, refletindo assim em uma baixa resistência mecânica, além de apresentarem aparência opaca e uma possível promoção de sabor estranho, devido aos processos de oxidação (BATISTA, 2004; RIGO, 2006).

Para melhorar as funcionalidades dos filmes normalmente são realizadas misturas de hidrocolóides (proteínas ou polissacarídeos) com substâncias hidrofóbicas (lipídios), formando então os filmes compostos, nos quais os polímeros que são adicionados podem interrelacionar-se física e quimicamente, obtendo assim um filme de melhor qualidade, funcionalidade e aplicações (BATISTA, 2004).

Nos filmes, diversos componentes são utilizados para sua elaboração, sendo suas formações constituídas de, pelo menos, um agente formador de filme (proteína, carboidrato, lipídeos, etc.), plastificante (glicerol, sorbitol, etc), solventes (água, etanol, etc), agentes ajustadores de pH (ácido acético, hidróxido de amônio, etc) e aditivos (antioxidantes, antimicrobianos, vitaminas, etc) (MALHERBI, 2015).

### **3.2.2 Gelatina**

A indústria da gelatina apresenta um desenvolvimento tecnológico constante. Hoje, é um setor de altíssimo nível tecnológico, aplicando os mais rigorosos sistemas de controle de qualidade. Assim, apesar de sua venerável antiguidade, a gelatina é um produto moderno e atual, que é utilizado amplamente na indústria alimentícia, onde é bastante utilizada como gelificante, espessante, emulsificante, além de fazer parte da composição de filmes, bem como em outros setores industriais, como: indústrias farmacêuticas para a obtenção de cápsulas e hidrogel para liberação de substâncias ativas, indústria têxtil e fotografia na forma de adesivos (LIN et al., 2017).

Conforme Almeida (2016), a gelatina tem propriedades tecnológicas que estão associadas a geleificação, como: a resistência do gel, o tempo de geleificação, temperatura de fusão e viscosidade. E a propriedade que está relacionada ao comportamento da superfície da gelatina, tais como: formação e estabilização de espumas e emulsões, propriedades adesivas, além de seu comportamento e dissolução.

Segundo Johnston-Banks (1990), quando em contato com água fria, a gelatina é insolúvel, já em temperatura acima de 40°C solubiliza completamente. Podendo solubilizar pelo método indireto ou direto, sendo o primeiro da seguinte forma: a gelatina é adicionada em água fria, umedecendo as partículas de forma uniforme e deixando-as em repouso para inchar, por tempo suficiente para a massa se tornar macia e frágil, posteriormente é mantida em repouso para ocorrer o processo de intumescimento destas. A solução é formada totalmente depois que essa massa passa pelo aquecimento (50-60°C) sob agitação constante para uma completa dissolução, e o segundo é aquele que elimina a etapa de imersão a frio,

porém exige temperatura mais elevada (60-80°C), além de agitação em alta velocidade, a fim de garantir ausência de aglomeração quando a gelatina for adicionada ao líquido.

A gelatina é utilizada para aumentar a elasticidade, consistência e estabilidade de produtos alimentícios, devendo, desta forma, apresentar boas propriedades reológicas (força de gel, viscosidade e ponto de fusão). As gelatinas também podem funcionar como um filme externo para a proteção contra desidratação, luz e oxigênio (BUENO, 2008).

### 3.2.3 Quitosana

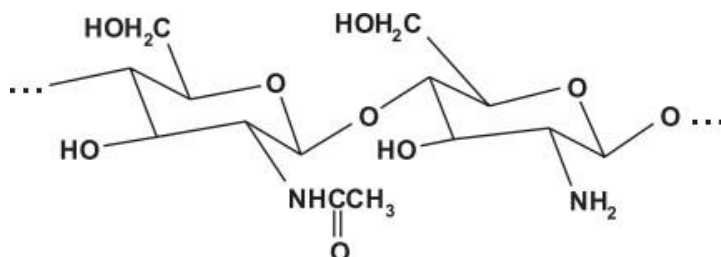
Para Azevedo et al. (2007), o uso de polímeros naturais para aplicações diversificadas tem sido de vital importância para os avanços das ciências e apresentam várias vantagens como ser de fácil obtenção, ser biocompatível e biodegradável.

Qitosana é um polissacarídeo derivado do processo de desacetilação da quitina (copolímero de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosamina e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glucosamina), que é encontrada em abundância na natureza, principalmente em carapaça de crustáceos, resíduo rejeitado pela indústria pesqueira, que em muitos casos as consideram poluentes (AZEVEDO et al., 2007; CANELLA e GARCIA, 2001).

Em concordância com Azevedo et al. (2007), ambas as estruturas são constituídas por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$  (14) entretanto os polímeros diferem quanto à proporção relativa dessas unidades e quanto à solubilidade.

Conforme Laranjeira e Fávere (2009), a insolubilidade da quitina é o maior fator limitante da sua utilização. Já o biopolímero, quitosana, pode facilmente se dissolver em soluções de ácidos fracos diluídos, devido à protonação de seus grupos amino, sendo o ácido acético o solvente mais empregado. A Figura 1 mostra a estrutura das unidades poliméricas da quitina ou quitosana, dependendo do grau de desacetilação.

Figura 1 – Estrutura química da quitina ou quitosana.

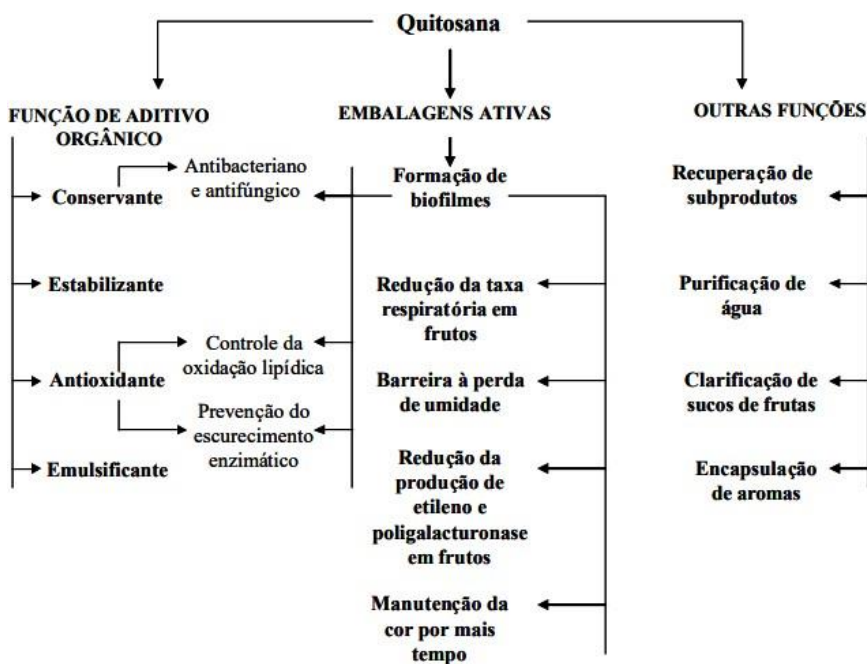


Fonte: Laranjeira e Fávère (2009).

Possui uma estrutura molecular quimicamente similar à fibra vegetal chamada celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais (AZEVEDO et al., 2007).

A quitosana é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. Na indústria alimentícia, a quitosana vem sendo explorada em diferentes aplicações, como demonstradas na figura 2. A mais utilizada recentemente é como material biodegradável antimicrobiano para produção de embalagem alimentícia (MACHADO, 2021).

Figura 2 – Esquema das aplicações da quitosana na indústria de alimentos.



Fonte: Fai, Stamford e Stamford (2008).

Para Fai, Stamford e Stamford (2008), neste âmbito de aplicação podem-se considerar os biofilmes a base de quitosana como embalagens ativas, pois além de atuarem como uma barreira a agentes externos apresentam uma série de funções desejáveis à manutenção da qualidade do vegetal ou fruto revestido. Apresenta como uma das vantagens, sobre a embalagem convencional, o fato da quitosana apresentar propriedades como agente antimicrobiano e antioxidante atendendo a atual demanda por alimentos minimamente processados e livres da incorporação de conservantes químicos.

Em estudo desenvolvido por Gómez-Estaca et al. (2010) com filmes à base de gelatina- quitosana, adicionadas de óleos essenciais como agentes antimicrobianos para preservação da carne de peixe do tipo bacalhau, obteve como principais resultados a redução do crescimento de bactérias gram-negativas (enterobactérias).

Para os autores, Silva et al. (2015), do estudo: utilização de filme de quitosana para controle de aflatoxinas em amendoim, verificou-se a utilização de um filme de quitosana para o controle do crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus*, demonstrando que a presença de quitosana no meio de cultura reduziu o diâmetro das colônias e promoveu modificações morfológicas nos esporos de *A. parasiticus*. E a utilização de quitosana a 2% na forma de filme, principalmente por aspersão, pode reduzir a concentração de esporos e aflatoxinas de *A. parasiticus* do amendoim.

Conforme trabalho realizado por Fonteles (2019), que avaliou os efeitos da incorporação do extrato da semente do urucum em coberturas ativas à base de quitosana na carne bovina, o uso das coberturas à base de quitosana e extrato de urucum, mostrou ser uma alternativa viável e eficaz para prover uma sanidade microbiológica e antioxidante mantendo as características físico-químicas quando inseriu os tratamentos, CQ: carne acondicionada em cobertura à base de quitosana e glicerol; EU4%: carne acondicionada em cobertura à base de quitosana, glicerol e 4% de extrato de urucum; EU8%: carne acondicionada em cobertura à base de quitosana, glicerol e 8% de extrato de urucum, durante toda vida de prateleira, podendo minimizar a utilização dos antioxidantes sintéticos e conferir maior segurança a carne.

### 3.3 AGENTE PLASTIFICANTE

A formação do filme polimérico envolve forças coesivas que podem resultar em filmes muito quebradiços. No entanto, esta limitação pode ser superada através da adição de um plastificante à formulação de forma a diminuir as forças intermoleculares, aumentando a

mobilidade das cadeias e melhorando a flexibilidade e o alongamento do filme (BIERHALZ e KIECKBUSH, 2009). Com isso há uma melhora da flexibilidade e da extensibilidade do filme, evitando assim a ruptura do mesmo durante o manuseio e armazenagem, porém podem aumentar a permeabilidade à gases, à solutos e ao vapor de água e podem diminuir a sua coesividade (BATISTA, 2004).

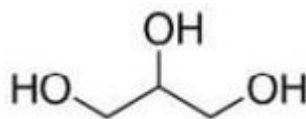
O plastificante é uma molécula pequena, de baixa volatilidade e de natureza química similar à do polímero usado na constituição do filme. Quando adicionado à solução filmogênica modifica a organização molecular aumentando o volume livre na molécula. Essa ação do plastificante causa alterações no plástico biodegradável como o aumento de flexibilidade, extensibilidade e distensibilidade seguido por diminuição na resistência mecânica, temperatura de transição vítrea e barreira a gases e vapor de água, isso devido à higroscopicidade do plastificante e sua ação na quebra da rede amilácea aumentando assim as interações amido-plastificante que diminuem a densidade das interações e conseqüentemente a coesão da molécula além do aumento do volume livre (GROSSMAN, 2007). Assim, plastificantes como glicerol são capazes de garantir boa qualidade na embalagem biodegradável, como em filmes. Além do glicerol, pode-se citar como agentes plasticantes: frutose, glicerina, sorbitol, propilenoglicol, ácidos graxos, dentro outros (ABREU, 2019).

### **3.3.1 Glicerol**

O glicerol é o principal coproduto gerado na produção de biodiesel, sendo que aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido corresponde ao glicerol (DASARI et al., 2005). Cerca de 68,4% do glicerol gerado a partir da produção de biodiesel do mundo é produzido na Alemanha, França, Estados Unidos, Argentina e Brasil (SARMA et al., 2012). Em território nacional, o Rio Grande do Sul é o maior produtor deste glicerol, sendo responsável por 28,3% da produção brasileira (ANP, 2016). Portanto, encontrar novos destinos de aplicação para o glicerol é muito importante a fim de assegurar a sustentabilidade da produção global de biodiesel.

O 1,2,3 propan-triol, comumente chamado de glicerol, tem a possibilidade de ser utilizado para diferentes aplicações por ser baseada nas suas propriedades físicas e químicas, que incluem: baixa volatilidade, higroscopicidade, efeito plastificante, promove flexibilidade, solubilidade, estabilidade, elevada viscosidade e ainda considerado um produto não-tóxico (ASSIS, 2009).

Figura 3 – Estrutura do glicerol



Fonte: Beatriz, Araújo e Lima (2011).

O glicerol vem sendo amplamente utilizado no processo de produção de biofilmes e considerado uma matéria-prima renovável que, por ser um plastificante, ao ser introduzido em filmes biodegradáveis promove alterações significativas de suas propriedades e, assim, garante uma ampla faixa de aplicação. Sem a ação deste plastificante, o filme tem uma estrutura rígida e quebradiça, o que torna inviável a sua produção (GONÇALVES, ANTUNES e SILVEIRA, 2019).

### 3.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

#### 3.4.1 Espessura

A espessura é um parâmetro importante uma vez que avalia a uniformidade do material, a repetibilidade da medida de suas propriedades e a validade das comparações entre os filmes. Servindo como base para várias propriedades dos filmes, incluindo as mecânicas e as de permeabilidade (JACOBS et al., 2020).

Quando a alíquota da solução filmogênica é depositada em suporte para secagem, é importante controlar o nível do local onde ele é mantido (por exemplo, estufas ou bancadas), para evitar diferenças na espessura dos filmes, provocadas pelo desnível do suporte (BATISTA, 2004). Para Júnior (2017), o controle da espessura dos filmes é importante para sua uniformidade, repetitividade das medidas de suas propriedades funcionais e validade das comparações entre as propriedades dos filmes. Uma não uniformidade na espessura dos filmes pode causar problemas mecânicos e de conservação. A espessura deve ser estabelecida levando-se em conta a utilização do filme, que vai depender do alimento que será embalado.

#### 3.4.2 Solubilidade

Define-se solubilidade em água de biofilmes como a quantidade de matéria seca que é



solubilizada após 24 horas de imersão. A avaliação dessa propriedade é essencial para se definir o campo de aplicação do filme (JÚNIOR, 2017). De acordo com Miller, Yamashita e Laurindo (2008), a solubilidade é influenciada pelo tipo e pela concentração do plastificante. Esses autores constataram que o glicerol e os grupamentos (-OH) do sorbitol aumentaram os valores de solubilidade do filme.

Biofilmes destinados a produção de embalagens ou revestimentos de produtos alimentícios devem ser insolúveis em meio aquoso para impedir o contato da umidade com o item armazenado, garantindo a sua integridade (LIMA, 2019).

### **3.4.3 Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)**

Segundo a ASTM E96-95 permeabilidade é a taxa de transmissão de vapor de água por unidade de área através do filme, de espessura conhecida, induzida por um gradiente de pressão entre duas superfícies específicas, de umidade relativa e temperatura especificada (ASTM, 1990).

O ensaio de permeabilidade ao vapor d'água avalia a transferência de vapor de água através de filmes permeáveis e os resultados desta análise são importantes para filmes destinados a embalagens. Isso se deve ao fato de que o filme destinado para embalagem alimentícia possui a finalidade de proteger o alimento contra agentes externos (MACHADO, 2021).

Segundo Farias, Lima e Carvalho (2011), a solubilidade terá uma ligação direta com os componentes estruturais do filme e interferirá na propriedade de barreira ao vapor de água nos filmes comestíveis. A obtenção de filmes com boas propriedades de barreira ao vapor de água, isto é, com baixa permeabilidade dentro de uma grande faixa de umidade relativa, implica na utilização de material insolúvel ou de pouca solubilidade em água, mas isto não desqualifica o filme, que dependerá do produto a ser aplicado.

### **3.4.4 Propriedades mecânicas**

O estudo das propriedades mecânicas do biofilme permite avaliar as interações moleculares entre os componentes e a quantidade de energia que o filme absorve antes do seu rompimento. Dependendo da aplicação, o biofilme deve apresentar resistência à ruptura e alongamento adequado. A natureza do filmogênica do material, a formulação do biofilme, o uso de plastificante e a metodologia utilizada na produção são fatores que afetam diretamente

nas propriedades mecânicas (ARENAS, 2012).

As propriedades mecânicas dos filmes comestíveis dependem da natureza do material filmogênico utilizado e de sua coesão estrutural, a qual está relacionada com a aptidão do polímero em formar fortes e/ou numerosas ligações à nível molecular entre duas cadeias poliméricas, dificultando assim a sua separação quando submetida a forças mecânicas. Esta aptidão depende da extensão da cadeia polimérica, da sua geometria, da dispersão do seu peso molecular, da natureza e posição de grupamentos laterais (GONTARD, 1991).

Essas propriedades podem ser avaliadas pelo teste de tração, no qual é aplicada uma força no filme, sendo registrada a deformação até atingir o rompimento, formando uma curva de tensão na ruptura versus deformação do filme (OLIVEIRA et al., 1996).

### **3.4.5 Propriedades organolépticas**

Para Vicentini (2003), dentre as propriedades óticas de biofilmes para aplicação em embalagem, destacam-se a cor e a transparência (opacidade). A cor pode ser considerada um importante parâmetro na caracterização dos biofilmes, pois está relacionada com a matéria-prima utilizada na elaboração dos mesmos. A determinação do grau de opacidade de um material mostra sua maior ou menor transparência. O filme que tem a transparência mais baixa é caracterizado por ter um maior bloqueio da passagem da luz.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 OBTENÇÃO DO BAGAÇO DE OLIVA**

O bagaço de oliva, da variedade 'Arbequina', foi obtido de uma empresa extratora de azeite de oliva, localizada na cidade de Cachoeira do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil (30°00'36.0"S 52°52'02.1"W). O azeite de oliva foi extraído pelo método de extração bifásica; e o resíduo de bagaço de oliva, transportado em caixas térmicas com gelo, chegando ao laboratório foi imediatamente armazenado a -18°C.

### **4.2 PREPARO DA AMOSTRA**

O bagaço de oliva, segundo metodologia Speroni (2019), com modificações foi separado em uma peneira de 2 mm. A amostra retirada da peneira (compostas por partículas

maiores que 2 mm) foi denominada F1. A amostra que passou pela peneira era composta por partículas maiores que 2 mm e líquido. Após, essa fração foi centrifugada (3.000 RPM por 15 min). O sobrenadante líquido e as amostras F1, foram guardadas para posterior análise. Enquanto a fração sólida, composta por partículas maiores que 2 mm, foi denominada F2. A amostra F2 foi liofilizada (TERRONI, modelo LS 3000, Brasil), moída em moagem convencional, por moinho de facas, e armazenadas, em freezer doméstico convencional, à temperatura de -18°C até o término deste estudo (Speroni, 2019).

#### 4.3 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS

A extração dos compostos antioxidantes da farinha foi realizada conforme estudos de Goldsmith, com modificações. Para razão amostra/ solvente foi utilizado 1g de F2 para 50 ml de solvente. Os métodos de extrações utilizados foram de banho de ultrassom com 40 hertz de frequência e convencional (agitação em banho-maria). Para definir a concentração do solvente hidroetanólico e tempo utilizado, foi realizado delineamento fatorial 2<sup>2</sup> (quatro ensaios fatoriais) com três repetições no ponto central (Tabela 1), totalizando sete ensaios. Todos os ensaios foram executados em ordem aleatória e as respostas ou variáveis dependentes, analisadas em triplicata. A temperatura utilizada manteve-se em 60°C.

Tabela 1 – Delineamento experimental 2<sup>2</sup> para preparação dos extratos para método convencional e ultrassom.

Tratamentos	Tempo (min.)	Álcool (%)
1	10 (-1)	60 (-1)
2	30 (+1)	60 (-1)
3	10 (-1)	80 (+1)
4	30 (+1)	80 (+1)
5 ©	20 (0)	70 (0)
6 ©	20 (0)	70 (0)
7 ©	20 (0)	70 (0)

Fonte: Autora.

Para a produção dos filmes foi escolhido a melhor condição de cada tratamento, tanto para o método de ultrassom como para o convencional. Antes de ocorrer a aplicação dos

extratos nos filmes, foi realizada a evaporação do etanol com o Nitrogênio.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

##### 4.4.1 Conteúdo Fenólico Total

Para estimar o conteúdo fenólico total foi realizada a metodologia proposta por Singleton Orthofer e Lamuela-Raventos (1999), com modificações por Roesler (2007), que sugere incubar os tubos por 5 minutos em banho-maria a 50°C. Quatrocentos microlitros de amostras previamente diluídas na proporção de 1:50 ( $v v^{-1}$ ) foram adicionados a 2mL de 10% ( $v v^{-1}$ ) de reagente Folin-Ciocalteu 2N (diluído 1:10). Após agitação, os tubos foram deixados no escuro por três minutos. Em seguida, foram adicionados 1,6 mL de solução de carbonato sódio a 7,5% (m/v). Os tubos foram agitados novamente e então incubados por cinco minutos em banho-maria a 50°C. A absorbância foi medida em 765nm. O branco foi preparado nas mesmas condições; no entanto, com substituição do extrato. Uma curva padrão foi realizada para quantificação utilizando ácido gálico em concentrações de 10 a 500 mg.L<sup>-1</sup>. Os valores foram expressos em mg de ácido gálico em g de amostra (mg GAE g<sup>-1</sup>).

##### 4.4.2 Atividade antioxidante (DPPH)

A atividade antioxidante das amostras de filme foi avaliada usando o ensaio de eliminação de radical livre DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) de acordo com Dal Prá et al. (2015). Brevemente foi adicionado 1500 µL de extrato do filme para 1480 µL de solução DPPH mais 20 µL de metanol. Um ensaio em branco foi realizado usando 1500 µL de metanol em vez do extrato. Além disso, um branco para cada amostra foi realizado utilizando 1500 µL de extrato e 1500 µL de metanol. A solução resultante foi deixada em repouso no escuro por 30 min. Em seguida, a absorbância das amostras foi determinada em 517 nm. A atividade antioxidante (AA%) contra o radical DPPH foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$AA\% = \left( \frac{A_{DPPH} - (A - A_B)}{A_{DPPH}} \right) \cdot 100$$

onde ADPPH, A e AB são a absorbância do branco da solução DPPH, amostra e branco da amostra, respectivamente.

#### **4.4.3 Flavonoides**

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com método proposto por Zhishen et al. (1999), através de reações das amostras com  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{AlCl}_3$  e  $\text{NaOH}$ , seguidas de leituras de absorbância em espectrofotômetro (510 nm). A amostra foi preparada em água na concentração de 10mg, homogeneizada em agitador magnético de tubos por 30 segundos, seguido de ultrassonicação a  $10^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Posteriormente, são diluídas em diferentes concentrações. A quantificação de flavonoides totais da amostra foi realizada por meio de curva padrão preparada com catequina e expressa em equivalente de catequina. O resultado é expresso em mg de equivalente de catequina por 100g de amostra.

#### **4.4.4 Atividade antimicrobiana**

Atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de microdiluição em caldo e a análise das placas de 96 poços foi realizada por espectrofotometria, no comprimento de onda 620nm. Os resultados foram expressos em função da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração letal mínima (CLM), os ensaios microbiológicos foram realizados na Universidade Federal de Santa Maria.

### **4.5 PRODUÇÃO DOS FILMES COMESTÍVEIS DE GELATINA E QUITOSANA ADICIONADOS DO EXTRATO DE BAGAÇO DE OLIVA**

Conforme Galindo et al. (2019), com modificações, preparou-se as soluções de gelatina e quitosana (93% CAS:9012-76-4) separadamente. A quitosana 2% (m/v) foi dissolvida em ácido acético 1% (v/v) e mantida sob agitação magnética com aquecimento a  $45^\circ\text{C}$  por 1 hora. A solução de gelatina (GEL) 4% (p/v) com adição de glicerol (1 g/100 mL de solução de gelatina) foi dissolvida sob agitação magnética e aquecimento a  $55^\circ\text{C}$  por 35 min. Posteriormente, foi feita a mistura das duas soluções, na proporção de 1:1, com incorporação de 5% do extrato de bagaço de oliva. As soluções foram homogeneizadas em agitador magnético, por 4 min., vertidos 50 ml em folhas de transparência para impressora a

laser e deixados para secar em sala com controle de temperatura (25°C) e umidade (42%), over night. Os filmes produzidos foram: filme controle (FC) sem extrato, filme com 5 mL de extrato obtido pelo método convencional com solvente hidroetanólico a 60% (FEC60%) e filme com 5 mL de extrato obtido pelo método de ultrassom com solvente hidroetanólico a 80% (FEU80%), demonstrados na figura 4.

Figura 4 – Filme Controle, Filme com extrato 60% (FEC60%) e Filme com extrato 80% (FEU80%), respectivamente.



Fonte: Autora

#### 4.6 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DOS FILMES

Segundo Galindo et al. (2019), os filmes (1 g) foram misturados com 20 mL de etanol absoluto (Anidrol, Brasil) e homogeneizados a 6.000 rpm por 15 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante utilizado nas análises de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (Folin-Ciocalteu e DPPH), conforme metodologias citadas nos itens 4.4.1 e 4.4.2, respectivamente.

## 4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES

### 4.7.1 Análise Qualitativa

Na análise qualitativa, conforme Jacobs et al. (2020), avaliou-se os biofilmes quanto a sua aparência através de observações táteis e visuais. O biopolímero deve apresentar uma superfície homogênea e contínua, sendo assim, excluíram-se das análises os filmes defeituosos, que apresentaram bolhas e fissuras após o processo de secagem.

### 4.7.2 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrômetro digital (Mitutoyo Co., Kawasaki, Japão), com escala de 0-25 mm e precisão de 0,001 mm, realizada em quadruplicata, e cada amostra foi medida em 6 pontos diferentes, seguindo a ASTM F2251 – 13 (ASTM, 2013).

### 4.7.3 Umidade

A umidade, seguindo estudo realizado por Silva (2011), dos filmes, foi determinada coletando-se 3 (três) amostras de filme com cerca de 4 cm de área, tendo sido previamente medidas as suas respectivas massas em balança analítica e em seguida colocadas em estufa a 105°C por 24 horas. O cálculo da umidade foi realizado utilizando-se a equação 1:

$$U = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

Em que U é a porcentagem de umidade,  $m_i$  é a massa inicial e  $m_f$  é a massa final do filme após secagem.

### 4.7.4 Solubilidade

Pelo método de Gontard et al. (1994), com modificações, primeiramente, os filmes foram cortados em amostras de três discos de 2 cm de diâmetro de cada modelo de filme e secos em estufa a 105 °C por 24 horas e pesados em balança analítica para a determinação da porcentagem inicial de matéria seca ( $m_i$ ). Em seguida, as amostras foram imersas em 50 mL de água destilada a temperatura ambiente por 24 horas sob agitação em shaker orbital (MA-410, Marconi, Brasil) a 70 RPM. Após a imersão, as soluções e os discos foram retirados e

secos novamente em estufa a 105 °C por 24 horas e pesados para determinação da quantidade de matéria seca não solubilizada (mf). Calculou-se a massa do filme que solubilizou em água, ou seja, o teor de matéria insolúvel, utilizando a equação 2:

$$MS = (mi-mf)/mi \times 100 \quad (2)$$

$$MS = x \times 100$$

MS: porcentagem de material solubilizado (%); mi: massa inicial do material seco (g), e;  
mf: peso final do material seco não solubilizado (g).

#### **4.7.5 Permeabilidade ao vapor de água**

Foram realizadas de acordo com o método padrão modificado ASTM E96-90 (ASTM, 1990), onde foram feitas seis medidas das massas das células em balança analítica durante um período total de 25h (no início do teste e após 1h, 2h, 23h, 24h e 25 h). O teste foi realizado em triplicata para cada filme. A espessura do filme foi medida em micrômetro digital (Mitutoyo, Japão) com resolução de 0,001 mm e capacidade de 0-25 mm. As medições foram realizadas em cinco pontos aleatórios ao longo de cada amostra de filme.

#### **4.7.6 Ângulo de contato**

Conforme Brandalise (2017), as amostras foram segmentadas em retângulos (2 x 5 cm) e mantidas em ambiente controlado ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade de 50%) por 24h antes da análise. As condições experimentais foram: temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), água destilada como fluido de referência. As análises foram feitas sobre a superfície superior do filme. Como resultado da medida, considerou-se a média entre os ângulos direito e esquerdo da gota, o ensaio foi realizado em triplicata, o gotejamento foi feito em três regiões distintas da amostra.

#### **4.7.7 Espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR)**

Os biofilmes foram analisados utilizando-se a espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier. A análise das amostras foi realizada empregando-se um espectrofotômetro Nicolet Nexus 670 (Nicolet Instrument Corporation, EUA). As amostras foram moídas com brometo de potássio (KBr) e prensadas para a



obtenção de pellets. Todas as amostras de filme foram analisadas entre 4.000 e 400  $\text{cm}^{-1}$  números de onda, e os espectros foram coletados com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e um total de 128 varreduras consecutivas foram registradas.

#### **4.7.8 Propriedades de tração**

De acordo com Antunes et al. (2019), as propriedades de tensão na ruptura (MPa), alongação (%) dos filmes foram determinadas na Máquina Universal de Ensaio (Instron. Model 3369, Instron Corp., Canton, MA, USA). Foram preparados 6 corpos de prova de cada filme, com 1 cm de largura e 10 cm de comprimento, obtidos de acordo com a norma ASTM-D882-10 (ASTM, 2010), com adaptações, e submetidos à tração. Os valores foram obtidos pelo Instron Bluehill Universal Software (Norwood, MA, USA).

#### **4.7.9 Cor**

A cor foi avaliada através de colorímetro de acordo com o método 14-22 da AACC (2000), onde foram avaliados atributos de cor na superfície dos biofilmes:  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ ,  $C^*$  e  $h$ . A coordenada de cromaticidade  $a^*$  indicando a tendência da cor da região do vermelho ( $+a^*$ ) ao verde ( $-a^*$ ), a coordenada de cromaticidade  $b^*$  indicando a tendência de cor da tonalidade amarela ( $+b^*$ ) ao azul ( $-b^*$ ) e  $L^*$  indicando a luminosidade do branco ( $L^* = 100$ ) ao preto ( $L^* = 0$ ).

#### **4.7.10 Opacidade**

De acordo com Shiku, Hamaguchi e Tanaka (2003), as amostras foram cortadas em retângulos que foram aderidos a parede interna da cubeta de quartzo. Foi realizada a medição utilizando o comprimento de onda de luz visível em 600nm. Os resultados foram calculados da seguinte forma: absorvância da amostra dividida pela espessura dos filmes, obtendo-se assim a medida de opacidade do material.

#### **4.7. 11 Degradabilidade**

A degradabilidade do biofilme seguiu conforme descrito por Martucci e Ruseckaite (2009), com adaptações. O experimento foi realizado em bandeja plástica retangular, com

terra imitando a flora microbiana natural. A amostra de biofilme foi cortada em 2 x 3 cm, seguido de secagem em estufa a 60°C por 24 horas para remoção da umidade. A amostra foi adicionada individualmente em um envelope de sombrite (utilizados para jardinagem). Em seguida o envelope contendo o biofilme foi enterrado no solo. As amostras foram removidas a cada 2 dias para avaliar até sua total degradação.

## **5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos a ANOVA com comparação de médias por Tukey, considerando o nível de significância de 95% ( $p > 0,05$ ), pelo software Statistic 10.

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO**

Os resultados obtidos para os compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos da farinha de bagaço de oliva, dos tratamentos convencional (C), apresentados na tabela 2, e ultrassom (US) estão apresentados na tabela 3.

Tabela 2 – Compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante (DPPH) dos extratos para o método convencional.

Trat.	Álcool %	Tempo (min.)	Fenólicos totais mg/g de amostra seca	Flavonóides totais mg/g de amostra seca	DPPH $\mu\text{mol TEAC/g}$ de amostra seca
T1	60(-1)	10(-1)	446,94 $\pm$ 6,07ab	30,90 $\pm$ 1,21a	42,41 $\pm$ 1,10d
T2	60(-1)	30 (+1)	462,92 $\pm$ 5,47a	33,00 $\pm$ 1,01a	58,94 $\pm$ 0,05b
T3	80(+1)	10(-1)	421,26 $\pm$ 5,47bc	31,89 $\pm$ 1,11a	49,74 $\pm$ 1,13c
T4	80(+1)	30(+1)	310,833 $\pm$ 6,47d	34,49 $\pm$ 1,31a	66,81 $\pm$ 0,89a
T5	70 (0)	20 (0)	421,250 $\pm$ 4,28bc	33,19 $\pm$ 1,21a	48,77 $\pm$ 1,69c
T6	70 (0)	20 (0)	413,611 $\pm$ 4,87c	33,07 $\pm$ 1,21a	49,26 $\pm$ 0,09c
T7	70 (0)	20 (0)	425,39 $\pm$ 6,17bc	35,59 $\pm$ 1,10a	48,17 $\pm$ 1,05c

Os valores são expressos com média e desvio  $\pm$  DP (n = 3). a – c Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

A partir do conteúdo de fenólicos totais foram feitas as escolhas das melhores condições de cada método para preparação dos filmes ativos. As melhores condições foram o T2C (462,92 mg GAE  $\text{g}^{-1}$ ) para o método convencional, com extração hidroalcolica a 60% e tempo de 30 min. (Tabela 2) e o T4US (524,03 mg QE  $\text{g}^{-1}$ ) para o método de ultrassom, com extração hidroalcolica a 80% e tempo de 30 min. (Tabela 3), também. Paulino et al. (2020), encontraram 73,58 mgGAE. $\text{g}^{-1}$  de fenólicos em extrato de bagaço de oliva, utilizando o método de maceração dinâmica com solvente água em uma temperatura de 60°C. Já o estudo apresentado por Costa et al. (2020), na extração dos compostos fenólicos do bagaço de oliveira, foram extraídos através da maceração em banho metabólico em temperatura constante de 80°C avaliando o pH (2,5), utilizando a água como solvente, encontraram 41,30 mgGAE. $\text{g}^{-1}$ .

Tabela 3 – Compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante (DPPH) dos extratos para o método ultrassom.

Trat.	Álcool %	Tempo (min.)	Fenólicos totais mg/g de amostra seca	Flavonóides totais mg/g de amostra seca	DPPH $\mu\text{mol TEAC/g}$ de amostra seca
T1	60(-1)	10(-1)	433,75 $\pm$ 4,32bc	29,11 $\pm$ 0,92c	55,43 $\pm$ 0,08b
T2	60(-1)	30 (+)	459,44 $\pm$ 3,18b	29,61 $\pm$ 0,72c	38,01 $\pm$ 1,08d
T3	80(+1)	10(-1)	408,06 $\pm$ 3,56c	33,12 $\pm$ 0,22bc	47,33 $\pm$ 0,89c
T4	80(+1)	30(+1)	524,03 $\pm$ 3,08a	33,31 $\pm$ 0,02abc	57,73 $\pm$ 0,54b
T5	70 (0)	20 (0)	433,06 $\pm$ 4,12bc	35,59 $\pm$ 0,12ab	68,13 $\pm$ 1,08a
T6	70 (0)	20 (0)	435,83 $\pm$ 2,90bc	32,57 $\pm$ 0,32bc	67,89 $\pm$ 0,65a
T7	70 (0)	20 (0)	432,36 $\pm$ 2,18bc	37,59 $\pm$ 0,22a	68,99 $\pm$ 1,00a

Os valores são expressos com média e desvio  $\pm$  DP (n = 3). a – c Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Todavia, Brito (2016) realizou a extração de fenólicos pelo método de ultrassom por 15 minutos, e obteve  $568,6 \pm 43,3$  mg EAG/100 g de bagaço, aproximando-se dos resultados encontrados nesse estudo. Observando os tratamentos escolhidos nota-se que os valores de fenólicos aumentaram 13,2% do método convencional para o de ultrassom, apesar do tempo de extração ser o mesmo (30 min.). Para Viciniescki (2020), o ultrassom tem como princípio a ação de ondas mecânicas de baixa frequência, as quais geram cavitação, fenômeno que gera e colapsa bolhas de água que resultam em pontuais áreas de altas temperaturas e pressão na superfície da amostra, facilitando o processo de extração. Conforme Brito (2016), este fato mostra que o tempo de sonificação pode ser um parâmetro importante na extração dos compostos bioativos, fato que pode ser visto neste trabalho.

Entretanto a condição 7 o T7US, diferencia-se estatisticamente dos demais com maior teor de flavonóides, o tempo de extração pode estar relacionado com essa diferença, pois os tratamentos escolhidos (TC2 e T4US) passaram por uma extração de 30 minutos, enquanto o tratamento T7US teve uma extração de 20 minutos, o que pode ter aumentado os flavonoides nesse tratamento. Para Soares (2019), o teor de flavonóides totais no bagaço de oliva, nos extratos em etanol e em água, obtidos da extração em Soxhlet, foram de 102,1 mg

equivalentes de catequina /g de extrato em etanol e 44,2 mg equivalentes de catequina /g de extrato em água. Brito (2016), demonstra em seus resultados valores totais de flavonóides de  $11 \pm 0,22$  mg/100 ml no bagaço de azeitona, usando uma mistura de etanol e água (70/30 v/v) em temperatura ambiente. Essa diferença entre os resultados encontrados com a literatura pode estar relacionada por diversos motivos, como os parâmetros utilizados para extração, os fatores edafoclimáticos podem influenciar no perfil de compostos fitoquímicos, além das práticas agrícolas, cultivar ou o estágio de maturação (VASCONCELLOS et al., 2020).

Os valores de atividade antioxidante obtidos para as condições dos tratamentos T2C e T4US são de 58,94% e 57,73%, respectivamente. Valores próximos ao estudo realizado por Lafka e colaboradores (2011), de 59,8%, utilizando o etanol como solvente para extração. Valores inferiores a encontrados por Silva (2021), onde a atividade antioxidante foi de 73,70%.

Conforme Vasconcellos et al. (2020), a estrutura do composto fenólico é determinante para as propriedades de sequestro e inibição de radicais livres. Para exercer a função biológica como ação antioxidante, é necessário que os compostos sejam capazes de impedir, retardar ou evitar a oxidação medida pela ação do radical livre, para isso, o número de grupos hidroxilas e sua posição em relação ao grupamento carboxila são de suma importância para ocorrência da ação antioxidante.

## 6.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A efetividade antimicrobiana de uma substância é frequentemente descrita em termos de sua concentração inibitória mínima (CIM), a menor concentração da substância que tem a capacidade de inibir totalmente o crescimento de um micro-organismo selecionado e a concentração letal mínima (CLM) é considerada a menor concentração de substância capaz de aniquilar 99,9% das unidades formadoras de colônia (UFC). Os valores de CIM e CLM foram testados nos extratos (T2C E T4US), tanto para bactérias, tabela 4, como para fungos, tabela 5, e comparados com o controle positivo.



<i>Klebsiella pneumoniae</i>	125	500	250	>500	6.25	200	100	200
<i>Morganella morganii</i>	62.5	500	250	>500	6.25	50	200	200
<i>Enterobacter aerogenes</i>	62.5	>500	125	>500	1.56	12.5	200	200

MIC 50: concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% do crescimento do micro-organismo ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); CLM: concentração letal mínima ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); Cloranfenicol e Ampicilina: controles positivos.

Tabela 5 - Concentrações inibitórias e letais mínimas para fungos dos extratos (T2C e T4US) de farinha de bagaço de oliva.

### Fungos

	Extrato T2C		Extrato T4US		Fluconazol		Nistatina	
	MIC	CLM	MIC	CLM	MIC	CLM	MIC	CLM
<i>Candida albicans</i>	500	>500	500	>500	25	100	50	100
<i>Candida dubliniensis</i>	500	>500	500	>500	3.12	12.5	50	100
<i>Candida glabrata</i>	500	>500	500	>500	3.12	200	50	100
<i>Candida krusei</i>	500	>500	500	>500	25	200	12.5	50
<i>Candida parapsilosis</i>	500	>500	500	>500	1.56	25	1.56	100
<i>Candida Tropicalis</i>	250	>500	500	>500	50	200	100	200

<i>Cryptococcus Gatti</i>	125	>500	250	>500	3.12	25	25	100
<i>Cryptococcus neoformans</i>	125	>500	250	>500	3.12	12.5	25	100
<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	500	>500	500	>500	1.56	25	1.56	3.12

---

MIC 50: concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% do crescimento do micro-organismo ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); CLM: concentração letal mínima ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); Fluconazol e Nistatina: controles positivos.

O extrato TC2 (Tabela 4), mostrou atividade inibitória para todas as bactérias, com valores de 62.5 a 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para concentração inibitória mínima (CIM), com bactérias gram positivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (62.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e bactérias gram negativas: *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Morganella morganii* e *Enterobacter aerogenes* (62.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Já para o extrato T4US os valores foram de 125 a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para concentração inibitória mínima (CIM), na qual foi maior para *Enterobacter aerogenes* (Gram -) com 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e obteve uma atividade inibitória menor para bactérias gram positivas, como: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis* (500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e bactérias gram negativas, como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* e *Escherichia coli* (500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os dois extratos mostraram uma boa atividade inibitória frente as cepas estudadas.

Resultados encontrados por Böhmer (2018) demonstra que o extrato do bagaço de azeitona apresentou atividade bacteriostática frente a *E. coli* e *S. aureus*, com concentração inibitória mínima de 1mg/mL<sup>-1</sup> para as duas bactérias, apresentando atividade inibitória mínima menores do que as encontradas nesse estudo, comparado aos dois extratos, que variaram de 62.5 a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Fleck et al. (2020), observou que para o extrato de bagaço de uva e da casca do mirtilo frente as cepas. *S aureus* ATCC25923, *B. cereus* ATCC14579 e *E. coli* ATCC2592, somente o extrato de mirtilo apresentou atividade antibacteriana contra *B. cereus*, sendo ela de 150 UA/mL, comparado com os valores encontrados, T2C e T4US, apresentaram atividade antimicrobiana frente as mesmas cepas. Friedman, Henika e Levin (2013), verificaram propriedades inibitórias de bagaço de azeitona usando um ensaio quantitativo de atividade bactericida contra patógenos de origem alimentar como *E. coli*, *L.*



*monocytogenes*, *S. enterica* e *S. aureus*, com valor de 0,008%. Essa atividade bactericida foi avaliada usando o valor BA (50), definido como a porcentagem da amostra na mistura de ensaio que resultou em uma diminuição de 50% nas unidades formadoras de colônias. Comparando com os extratos T2C e T4US para *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella entérica serovar typhimurium* também apresentaram uma atividade antimicrobiana positiva.

Para atividade inibitória fúngica (Tabela 5), os valores dos extratos variaram de 125 a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (CIM) para T2C e 250 a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (CIM) para o extrato T4US.

O efeito antibacteriano e antifúngico está relacionado à composição dos compostos bioativos dos extratos (BOEIRA, 2021). O grupamento hidroxila (-OH), está diretamente ligado aos compostos fenólicos, promovendo ação inibitória das bactérias, pois interagem com a membrana presente nelas, provendo sua ruptura (BÖHME, 2018), grupamento presente no Hidroxitol, composto que está presente no bagaço de azeitona (SPERONI, 2019).

Mendes et al. (2020) relata que apesar de não haver na literatura uma concordância entre os pesquisadores quanto ao padrão que deve ser estipulado para avaliação da concentração ideal de um extrato na inibição microbiana, alguns autores determinaram em seus trabalhos que valores de CIM devem ser definidos como inibição forte ou fraca dependendo da concentração do extrato. Conforme Duarte et al. (2006), o extrato deve apresentar concentração inibitória mínima de até 0,500  $\text{mg mL}^{-1}$  para ser considerado um agente antimicrobiano eficiente, entre 0,600 a 1,50  $\text{mg mL}^{-1}$  para moderado, e acima de 1,60  $\text{mg mL}^{-1}$  para ser considerado um agente antimicrobiano fraco. Com base nesses valores, tanto para o extrato TC2 quanto para o extrato T4US, pode-se dizer que podem ser considerados agentes antimicrobianos eficientes.

### 6.3 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES ATIVOS

De acordo com a tabela 6, para fenólicos totais, houve diferença estatística significativa entre os biofilmes, sendo que o biofilme com extrato obtido pelo ultrassom a 80% apresentou 176,46  $\text{mg/g}$  de amostra seca seguido do biofilme com extrato obtido pelo convencional a 60% 144,17  $\text{mg/g}$  de amostra seca. Pode-se notar que para atividade antioxidante também houve diferença significativa entre os tratamentos, coincidindo o maior valor de atividade antioxidante para o biofilme com extrato obtido por ultrassom seguido do biofilme com extrato convencional. Apesar de ter esse aumento positivo de compostos na produção dos biofilmes em relação ao controle, pode-se notar que houve uma redução dos valores em relação ao extrato (Tabela 2 e 3), essa perda de compostos pode estar relacionada

ao processo de preparação dos biofilmes. Por vezes, dentro do mesmo tipo de subprodutos é possível observar variações composicionais e extensão do processamento da matéria-prima que podem ter impacto na sua atividade antioxidante e propriedades biológicas (BRITO, 2016).

Tabela 6 – Compostos fenólicos e atividade antioxidante (DPPH) dos biofilmes produzidos.

Biofilmes	Fenólicos totais mg/g de amostra seca	DPPH μmol TEAC/g de amostra seca
Filme Controle	116,04 ± 7,37c	2,83 ± 1,03c
FEC60%	144,17 ± 7,22b	64,16 ± 1,53b
FEU80%	176,46 ± 4,42a	78,45 ± 1,05 <sup>a</sup>

Os valores são expressos com média e desvio ± DP (n = 3). a – c Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferença significativa (p<0,05).

Já o aumento de fenólicos e atividade antioxidante do FEU80% para o FEC60% está relacionado ao tratamento utilizado para extração dos compostos no extrato. Para Soquetta (2019), a extração convencional baseia-se no aquecimento e/ou agitação da matéria-prima com solventes orgânicos. As extrações não convencionais (extração por ultrassom) são consideradas promissoras, podendo reduzir ou eliminar o uso de solventes orgânicos e minimizar a degradação dos compostos de interesse. O ultrassom utiliza energia associada a altas temperaturas e pressões causadas pelo método destroem as paredes das células das amostras, libertando facilmente os compostos (BRITO, 2016). Isso explica o aumento de fenólicos e atividade antioxidante do FEU80% em relação a FEC60%.

Queiroz e Souza (2017), produziram uma embalagem bioativa de amido de mandioca com adição de extrato de jamelão com glicerol em sua formulação e obtiveram valores de 299,79 mg/100g de fenólicos, apesar de apresentar um valor maior do que os biofilmes produzidos, a porcentagem de extrato utilizada também foi maior (44,1%), em relação aos 5% utilizados na formulação dos biofilmes (FEC60% e FEU80%).

Costa et al. (2020) realizaram a extração dos compostos fenólicos provenientes do bagaço de oliva para aplicação como aditivo natural em biofilme ativo, mostrando que aumentou em 38% a atividade antioxidante em seu biofilme.

## 6.4 ESPESSURA, SOLUBILIDADE EM ÁGUA, UMIDADE E PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA DOS BIOFILMES

Os resultados de espessura, solubilidade em água, umidade e permeabilidade ao vapor de água (WVP) para os filmes controle e com adição de extrato de bagaço de oliva, estão descritos na tabela 7.

Tabela 7 – Espessura, solubilidade em água, umidade e permeabilidade ao vapor de água (PVA).

Biofilmes	Espessura (mm)	Solubilidade em água (%)	Umidade (%)	PVA (g-mm/kPa-h-m <sup>2</sup> )
Filme Controle	0,040 ± 0,0005a	32,931 ± 1,7066c	12,650 ± 0,0301b	0,209 ± 0,0202c
FEC60%	0,039 ± 0,0003a	71,513 ± 0,6970a	13,314 ± 0,0547a	0,885 ± 0,0385a
FEU80%	0,037 ± 0,0002a	45,834 ± 1,4829b	11,993 ± 0,1789c	0,583 ± 0,0426b

Os valores são expressos com média e desvio ± DP (n = 4). a – c Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferença significativa (p<0,05).

### 6.4.1 Espessura

Não houve diferença estatística na espessura dos filmes (Tabela 7), demonstrando que a adição do extrato de bagaço de azeitona não interferiu neste parâmetro. Sganzerla e Veek (2018), no desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis a base de amido de pinhão e pectina cítrica, contendo farinha da casca de goiaba serrana, para as cinco formulações propostas em seu estudo, a espessura aumentou conforme a adição da farinha, variando de 137mm a 188mm, espessura maiores do que as encontradas nos biofilmes FEC60% (0,039 mm) e FEU80% (0,037 mm), cabe ressaltar aqui que a adição foi de extrato do bagaço e não de farinha.

No estudo de Costa et al. (2020), a espessura aumentou após a adição do extrato do bagaço de oliva no biofilme ativo, de 104 mm do filme controle (sem adição de extrato) para 0,106 mm, valores maiores do que a espessura dos filmes produzidos nesse estudo.

A espessura é um dos parâmetros que influencia nas propriedades dos filmes, por meio dela avalia-se a homogeneidade e a uniformidade dos materiais. O controle da espessura dos biofilmes é difícil, sobretudo nos processos de produção do tipo casting, onde ocorre a secagem por evaporação do solvente. Quando se trabalha com soluções filmogênicas viscosas,

este controle torna-se mais difícil (SOBRAL, 1999), sendo o caso dos biofilmes produzidos com glicerol. Essa relação de diferença de espessura entre os filmes produzidos e a literatura, pode estar relacionada com a forma que a farinha de bagaço de azeitona, ou demais farinhas, são aplicadas no filme. A aplicação em forma de extrato proporciona maior uniformidade para o biofilme produzido. A solução filmogênica por ser mais viscosa vertida em folhas de transparência para impressora a laser pode ter ajudado na uniformidade dos filmes, ajudando em sua repetibilidade, pois a forma como é disposto no recipiente para secar (figura 5) e quantidade de solução utilizada podem interferir na espessura.

Figura 5 – Padronização dos biofilmes.



Fonte: Autora.

Isso pode ser observado no estudo de Silva et al. (2015), nos quais obtiveram valores de 0,0938 mm para filmes com 2% de quitosana em uma solução filmogênica de 55 ml e de 0,101 mm para a mesma proporção de quitosana, porém em 70 ml de solução.

#### **6.4.2 Solubilidade em água**

A solubilidade em água direciona a aplicação do biofilme como embalagem para produtos alimentícios. Pode-se visualizar (Tabela 7), que todos os filmes diferiram estatisticamente entre si, os biofilmes adicionados de extratos foram mais solúveis que o controle, entretanto o biofilme elaborado com extrato obtido pelo método convencional foi o mais solúvel, seguido pelo biofilme com extrato obtido pelo ultrassom, provavelmente a sonificação do método tenha extraído algum composto que contribuiu para aumentar a solubilidade do biofilme. De acordo com Fakhouri et al. (2007), a solubilidade em água pode

direcionar para qual produto o filme pode ser utilizado, por exemplo, em produtos semiprontos que requerem cozimento no seu preparo a solubilização do filme é benéfica.

Em contrapartida, Crizel et al. (2018), estudaram a solubilidade do filme de quitosana adicionados de micropartículas de bagaço de azeitona, em diferentes porcentagens (10%, 20% e 30%), e perceberam que a solubilidade se manteve baixa (31,31%; 28,64 e 26,16%; respectivamente).

Eça et al. (2015) elaboraram filmes de pectina (2g/100mL água), glicerol (1,5 g/g de pectina) e cloreto de cálcio (0,005g/g de pectina) contendo extratos frutas (acerola, caju e morango) (0,5g do total sólidos/g de pectina) com elevada solubilidade em água:  $65,3 \pm 1,5$  utilizando extrato de acerola,  $73,1 \pm 4,3$ , para extrato de caju e  $70,5 \pm 3,7$  para extrato de morango, compatíveis com os resultados obtidos para FEC60%.

### **6.4.3 Umidade**

A umidade obteve diferença estatística entre os tratamentos. Crizel et al. (2018), para filmes produzidos com 10% de farinha de bagaço de oliva obteve 18,97% de umidade, valores maiores do que o encontrado nesse estudo, essa diferença pode ser explicada pela forma de adição do bagaço de oliva (farinha e extrato) na produção dos filmes. Dantas et al. (2015), obteve valores que variaram de 10,93% a 19,69%. Para os filmes com adição de polpa de acerola e manga apresentaram umidades inferiores às encontradas para o controle deles (15,53%), valores de umidade ainda maiores do que os biofilmes de extrato de bagaço de azeitona (FEC60% e FEU80%).

### **6.4.4 Permeabilidade ao vapor de água**

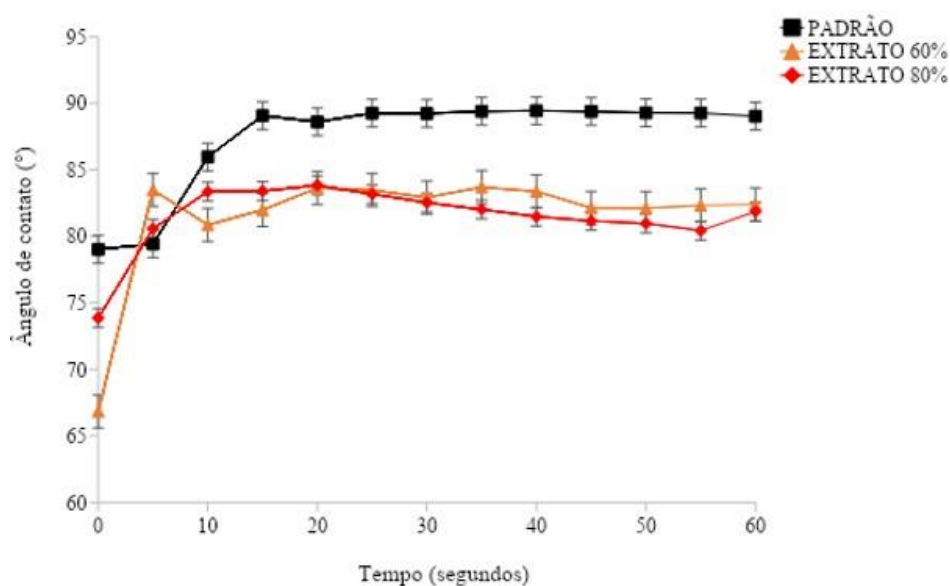
A permeabilidade ao vapor de água (PVA) indica o quão permeável o filme é a moléculas de água. Os resultados da tabela 7 mostram que há diferença significativa entre todos os tratamentos, o controle apresenta menor permeabilidade ao vapor de água, seguido pelo FEU80% e FEC60%, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Crizel et al., (2018) ao adicionarem farinha do bagaço de oliva em biofilmes de quitosana, à medida que aumentavam a concentração de farinha, mais permeável era o biofilme ao vapor de água (a farinha pode causar irregularidade aos filmes). Albertos et al. (2017) produziram filmes de gelatina adicionados de extratos de folhas de oliveira e obtiveram PVA semelhantes ao encontrado neste estudo (0,73 a 1,68 g.mm/kPa.h.m<sup>2</sup>). O processo de transferência de

vapor de água depende das ações simultâneas de solubilidade da água e difusibilidade da matriz polimérica. Zhong e Song (2011), neste estudo os biofilmes não reduziram a solubilidade em água porque os grupos (OH) não se ligaram a quitosana e gelatina da matriz polimérica. Segundo Sanchez-Ganzalez (2010) pode ser também pela diferença na fonte de quitosana, grau de desacetilação, peso molecular, entre outros.

## 6.5 ÂNGULO DE CONTATO

A técnica de determinação do ângulo de contato ou ângulo de molhabilidade (hidrofobicidade ou hidrofiliçidade) representa o valor em graus que uma determinada substância líquida forma com a superfície através da sua polaridade (FARIAS, LIMA e CARVALHO, 2011). Para Vogler (1998), forças atrativas de longo alcance são detectadas apenas entre superfícies que exibem um ângulo de contato com água  $\theta > 65^\circ$  (superfícies hidrofóbicas) e forças repulsivas são detectadas entre superfícies exibindo  $\theta < 65^\circ$  (superfícies hidrofílicas). A figura 6 demonstra os valores do ângulo de contato dos filmes.

Figura 6 – Valores do ângulo de contato dos biofilmes ativos (FEC60% e FEU80%) e sem extrato (padrão).



Observa-se que o ângulo de contato da água com a superfície dos filmes para os biofilmes ativos (FEC60% e FEU80%) obtiveram valores menores do que o padrão, mas ainda sim mantiveram suas características de superfícies hidrofóbicas, com ângulo maior que  $65^\circ$ , isso quer dizer que não absorvem ou não se misturam com a água.

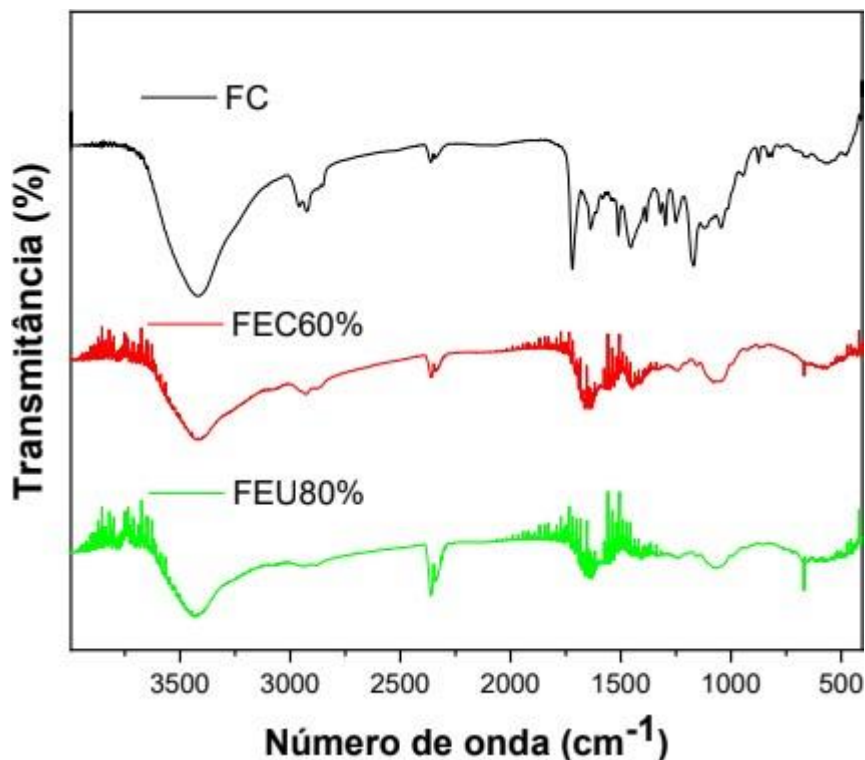
Essa característica hidrofóbica dos filmes pode estar relacionada a sua composição. O glicerol é uma substância considerada higroscópica (absorve umidade), mas com a junção da quitosana, devido às fortes interações intermoleculares através de ligações de hidrogênio e à regularidade estrutural, apresenta insolubilidade em água (ALVES, SILVA e BALABAN, 2007). Santos et al. (2021), em seu estudo avaliação e caracterização de biofilme comestível de carboximetilcelulose contendo nanopartículas de quitosana e cúrcuma longa, relatam que a presença das nanopartículas de quitosana e da cúrcuma na matriz favoreceram o preenchimento dos espaços vazios da cadeia polimérica carboximetilcelulose, diminuindo assim a polaridade do filme, tornando-o menos permeável a moléculas de água e conseqüentemente, mais hidrofóbicos. O filme contendo apenas a carboximetilcelulose obteve ângulo de  $42,02^\circ$  e o filme com nanopartículas de quitosana, sem a cúrcuma, obteve  $83; 94^\circ$ . Isso pode ser explicado para os biofilmes produzidos, pois o bagaço de azeitona tem compostos como os lipídios (ácido oleico, ácido palmítico e ácido linoleico) (TOMÁS, 2018), considerados hidrofóbicos e compostos de caráter hidrofílico, além da gelatina, que possui afinidade com a água. A quitosana pode estar preenchendo esses espaços dos compostos presentes na composição do filme, considerados hidrofílicos, e mantendo a polaridade do filme, fazendo com que o ângulo de contato permaneça acima de  $65^\circ$ .

## 6.6 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Figura 7), foi realizada para avaliar se ocorreram interações entre os grupos funcionais dos materiais usados para a obtenção do biofilme. Analisando o espectro de infravermelho da quitosana com gelatina constata-se que o mesmo apresentou bandas de absorções na região entre  $3400\text{ cm}^{-1}$  referente às vibrações de estiramento dos grupos OH e NH. Na região em torno de  $2850\text{ cm}^{-1}$  observam-se vibrações de deformação axial referente a carbonos alifáticos C-N. Na região de  $3290\text{ cm}^{-1}$ , apresenta-se banda forte, larga, resultante da associação polimérica das vibrações de deformação axial do grupo O-H. Nas bandas  $1632, 1537$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$ , observa-se as vibrações do tipo deformação axial e angular de amins e amidas

substituídas do grupo N-H e do grupo CH<sub>2</sub> respectivamente. Nas regiões 1331, 1241, 1084 cm<sup>-1</sup>, é possível identificar as vibrações do tipo deformação axial e angular de carbonos

Figura 7 - Espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR), para os filmes controle, FEC60% e FEU80%.



aromáticos e alifáticos do grupo C-N e do grupo C-O de álcoois secundários, referentes a quitosana, resultados estão de acordo com os resultados obtidos por (CAMACHO et al., 2010 ; ARAUJO et al., 2017). Na região de 3290 cm<sup>-1</sup>, apresenta-se banda forte, larga, resultante da associação polimérica das vibrações de deformação axial do grupo O-H. Nas bandas 1632, 1537 e 1450 cm<sup>-1</sup>, observa-se as vibrações do tipo deformação axial e angular de aminas e amidas substituídas do grupo N-H e do grupo CH<sub>2</sub> respectivamente. Nas regiões 1331, 1241, 1084 cm<sup>-1</sup>, é possível identificar as vibrações do tipo deformação axial e angular de carbonos aromáticos e alifáticos do grupo C-N e do grupo C-O de álcoois secundários, referente à gelatina.

Analisando os espectros de FTIR dos filmes obtidos (Figura 7) de quitosana com



gelatina, com os filmes adicionados de extratos, pode-se notar que após a incorporação dos extratos houve uma diminuição da banda na região em torno de 2970 a 2850  $\text{cm}^{-1}$ , vibrações de deformação axial referente a carbonos alifáticos C-N, e um aumento na intensidade de todas as bandas, além disso pode ser observado na região 3290, 1540 e 1410  $\text{cm}^{-1}$  um deslocamento das bandas referente ao estiramento O-H e as bandas amina e amidas respectivamente, o que possivelmente evidencia a interação entre o extrato e a matriz polimérica.

## 6.7 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Na tabela 8 estão demonstrados os valores para resistência a tração e alongamento na ruptura. Maiores valores de alongamento na ruptura indicam maior flexibilidade do filme antes de ser rompido e a resistência a tração é um indicador da rigidez do filme, em que valores mais elevados indicam uma maior rigidez.

Tabela 8 – Resistência à tração (Mpa) e alongamento na ruptura (%)

Biofilmes	Resistência à tração (Mpa)	Alongamento na ruptura (%)
Controle	22,14 ± 3,40a	8,42 ± 3,83a
FEC60%	23,58 ± 5,30a	4,19 ± 0,72b
FEU80%	22,52 ± 5,11a	4,04 ± 0,41b

Os valores são expressos com média e desvio  $\pm$  DP (n = 6). a – c  
Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferença significativa (p<0,05).

Para resistência à tração (Tabela 8) os filmes não obtiveram diferença significativa (p>0,05), variando entre 22,14 a 22,52 Mpa entre si. Para o alongamento na ruptura os biofilmes diferiram estatisticamente do controle, mostrando menor alongamento (FEC60% com 4,19%, FEU80% com 4,04%, e o controle 8,42%).

As propriedades mecânicas dependem fortemente de formulação (macromolécula, solvente, plastificante, ajuste de pH) e do processo de obtenção e o teor de plastificante pode alterar as propriedades mecânicas, quando utilizados em menor quantidade, apresentam-se quebradiços (MONTERREY e SOBRAL, 1999).

Para Crizel et al. (2018), os valores encontrados para resistência a tração e alongamento na ruptura foram de 22,40 Mpa e 33,01%, respectivamente, para adição de 10% de farinha de bagaço de azeitona. Para resistência a tração os valores corroboram com os

encontrados nesse estudo, mas para o alongamento na ruptura obteve-se valores menores que os encontrados por eles, o que significa que os filmes são menos flexíveis.

No estudo de Diniz et al. (2011), para produção de biofilmes de gelatina e quitosana obtiveram 50 Mpa para resistência a tração e 2,8% para alongamento, sendo um filme de maior rigidez do que os filmes FEC60% e FEU80% e apresentando uma menor flexibilidade.

Segundo Ampessan e Giarola (2016) apud Krochta, Mulder-Johnson (1999), os filmes possuem propriedades mecânicas moderadas quando apresentam uma tensão no ponto da ruptura entre 10 e 100 MPa e uma deformação no ponto de ruptura entre 10 e 50%. Diante disso pode-se inferir que os filmes produzidos são considerados moderados para resistência a tração e fracos para alongamento na ruptura.

## 6.8 COR

Analisando a tabela 9, percebe-se que ocorreu uma diferença estatística entre os tratamentos da cordenada L\*. Pode-se observar também que não houve diferença estatística entre os tratamentos FEC60% e FEU80% para a mesma cordenada, enquanto a adição do extrato de bagaço de oliva diminui o valor da variável, tendo uma menor luminosidade ao branco. Para cordenada a\* o filme controle diferiu estatisticamente dos filmes ativos que obtiveram resultados negativos - 1,02 (FEC60%) e -1,04 (FEU%), indicando que o extrato de bagaço de oliva teve influência direta nesse parâmetro, pois indica a coloração verde. Já com a junção do extrato e a quitosana, os valores de b\*, para os filmes ativos obtiveram diferença estatística do controle, indicando uma tonalidade ao amarelo, devido ao extrato utilizado, e o controle ao azul. Segundo Casariego et al. (2009), o valor de b\* é o parâmetro que descreve a cor dos filmes a base de quitosana, devido à cor amarelada natural da quitosana, e é a coordenada cromática que influencia a diferença total da cor. Essa afirmação se contrapõe aos resultados obtidos, mas pode ser explicado devido a quantidade de quitosana utilizada e a espessura do filme que foi de 0,040 para o filme controle.

Siqueira et al. (2020), verificou que os valores de  $\Delta E$  aumentaram conforme a quantidade de bagaço de oliva adicionados nos filmes, os valores encontrados foram de  $24,23 \pm 2,89$  para o filme 1, com 0,15 g de bagaço de oliva, e de  $30,42 \pm 0,80$  para o filme 2, com 0,30 g de bagaço de oliva.

Para Nascimento et al. (2013), na produção de filmes com adição de 2% de quitosana obtiveram cordenadas para L\*, a\* e b\*, com os valores de 35,03; -3,40; 3,60; respectivamente. Diferindo dos valores encontrados para o filme controle (Tabela 9).

Para opacidade dos filmes, parâmetro importante, podemos observar que aumentou em comparação ao controle. Isso se deve pela adição do extrato de bagaço de oliva, indicando uma menor transparência no filme. Crizel et al. (2018), observou também o aumento de opacidade com a adição de farinha de bagaço de oliva em seus filmes (3,51), resultado parecido com os obtidos para FEC60% e 80%.

Tabela 9 – Cor e opacidade dos filmes controle, FEC60% e FEU80%.

Biofilmes	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	C*(D65)	h(D65)	Opacidade
Controle	90,79 ± 0,10a	0,47 ± 0,03a	-3,46 ± 0,20b	3,39 ± 0,21	277,73 ± 0,16a	2,34 ± 0,15c
FEC60%	88,02 ± 0,19b	-1,02 ± 0,11b	4,12 ± 0,81a	4,42 ± 0,82	103,32 ± 0,89b	3,12 ± 0,04b
FEU80%	87,99 ± 0,44b	-1,04 ± 0,15b	4,37 ± 1,12a	4,74 ± 1,12	104,71 ± 2,25b	3,94 ± 0,07a

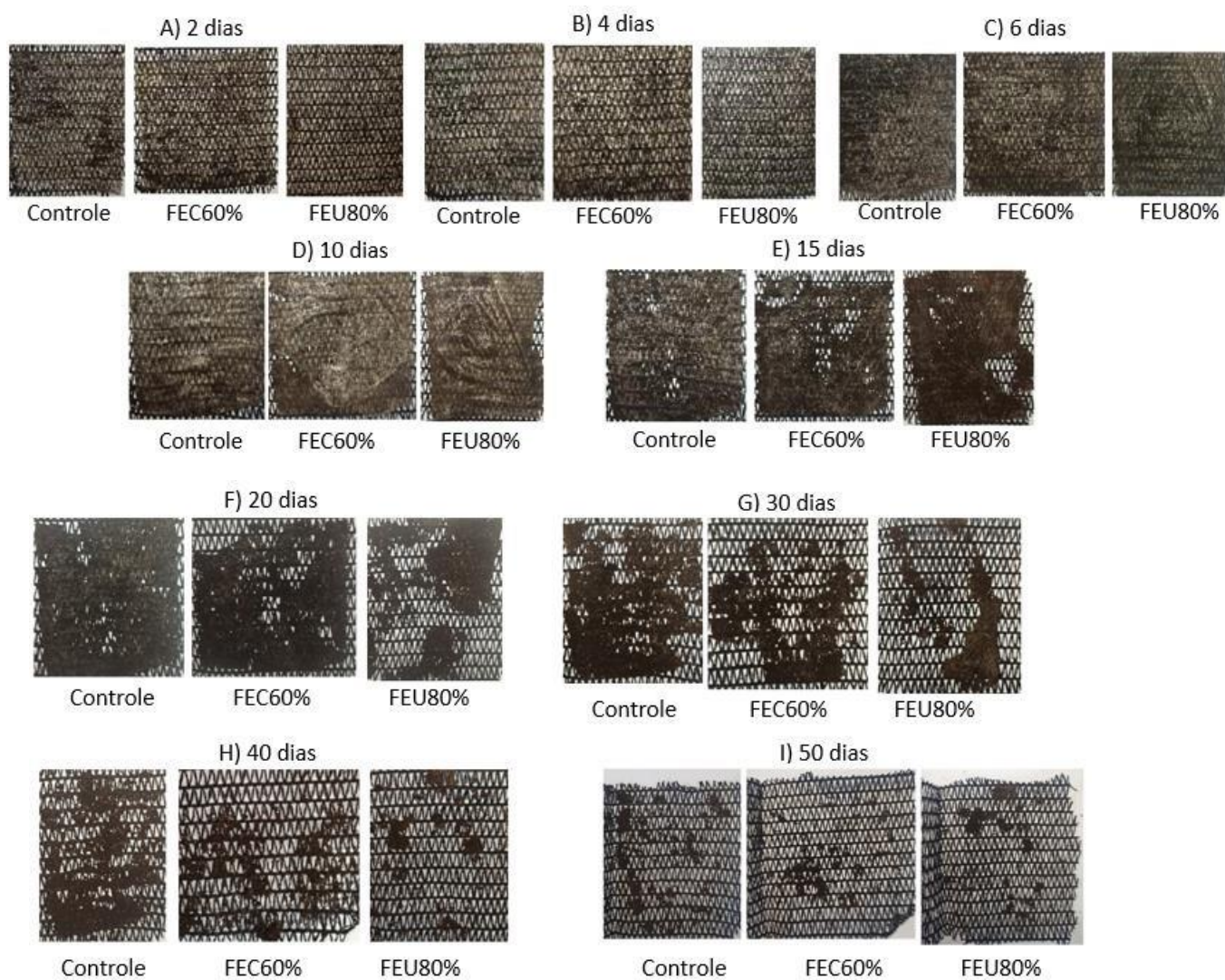
Os valores são expressos com média e desvio ± DP (n = 9). a – c Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferença significativa (p<0,05).

## 6.9 DEGRADABILIDADE

A figura 8 mostra como as amostras foram depositadas sobre o solo. O teste foi iniciado no dia 27 de junho de 2021, sendo acompanhado para avaliar o processo de degradação dos filmes nos últimos meses, sendo definido como dia 0 o início do teste.

Figura 8 – Teste de degradabilidade com as amostras expostas sobre o solo, controle (P1), FEC60% e FEU80%. Início (dia 0); A) 2 dias; B) 4 dias; C) 6 dias; D) 10 dias; E) 15 dias; F) 20 dias; G) 30 dias; H) 40 dias; I) 50 dias.

Início (dia 0)



Fonte: Autora.

A incorporação de agentes ativos na matriz polimérica vem ganhando espaço em pesquisas e desenvolvimento de embalagens, pois podem resultar em embalagens ativas. A definição de embalagens ativas define que esse tipo de material interage com os alimentos, corrigindo deficiências passivas e agindo de forma favorável na preservação e na qualidade dos alimentos, podendo aumentar a sua vida de prateleira, mantendo a qualidade do produto embalado e melhorando suas propriedades sensoriais (CARISSIMI, 2017).

Observa-se que ocorreu uma deterioração macroscópica nos filmes a partir do dia 15 (Figura 8E) até 50 dias (Figura 8I). Segundo Santos (2020), pela adição periódica de água, provavelmente ocorre a perda de compostos solúveis, fazendo com que os filmes percam seu aspecto inicial e integridade estrutural, demonstrando claramente a sua degradabilidade, ao final de 50 dias todos os filmes aparentam estar no mesmo nível de degradação.

Os polímeros naturais, chamados de agropolímeros, onde estão incluídos os polissacarídeos, as proteínas e os lipídeos podem ser utilizados na produção de embalagens biodegradáveis. Estes agropolímeros apresentam como vantagens a alta biodegradabilidade e o menor custo em relação aos polímeros sintéticos biodegradáveis (SCAPIM, 2009). Segundo Innocentini-Mei e Mariani (2005), a degradação é um processo irreversível que altera a estrutura do material sendo causada por fatores abióticos como calor, umidade, água, luz, estresse mecânico e oxigênio.

No trabalho desenvolvido por Santos (2020), na biodegradabilidade de filmes baseados em biopolímero e óleo essencial de erva-doce, foi possível observar a degradação dos filmes em 90 dias. Para Carissimi (2017), após 15 dias já foi possível observar a deterioração dos filmes produzidos a partir de mandioca e microalga verde. No Brasil não existe uma norma para biodegradabilidade de matérias, porém, de acordo com os resultados podemos considerar os biofilmes biodegradáveis, pois ao final de 50 dias sua deterioração foi quase completa.

## **7. CONCLUSÃO**

O extrato de bagaço de oliva mostrou-se promissor na incorporação dos biofilmes ativos, pois apresentou boa quantidade de fenólicos e ótima atividade antioxidante, além da sua atividade antimicrobiana para algumas bactérias e fungos. Os biofilmes produzidos também apresentaram fenólicos e atividade antioxidante.

Os biofilmes não mostraram diferença em relação a sua espessura, demonstrando que a adição do extrato de bagaço de oliva não interferiu neste parâmetro, para o parâmetro

solubilidade, os filmes adicionados de extrato mostraram ser mais solúveis que o controle. O biofilme elaborado com extrato obtido pelo método convencional foi o mais solúvel.

A medida do ângulo de contato mostrou a natureza hidrofóbica dos biofilmes com extrato de bagaço de oliva. Para análise de cor, a coordenada  $a^*$ , dos biofilmes ativos, obtiveram resultados negativos, indicando que o extrato de bagaço de oliva teve influência direta nesse parâmetro, indicando a coloração verde. E a opacidade foi ligeiramente maior do que o controle. Os biofilmes elaborados podem ser considerados biodegradáveis, pois ao final de 50 dias houve a degradação total.

Com base nas evidências acredita-se que a utilização da farinha do bagaço de oliva, possa contribuir para a sustentabilidade e redução do impacto ambiental, na medida em que pode ser usada na forma de extrato como antioxidante na preparação de biofilmes ativos como embalagens alimentícias.

## 8. REFERÊNCIAS

ABREU, C. T. de A. **Desenvolvimento de filme comestível enriquecido com própolis vermelha aplicado no revestimento de acerola (*Malpighia emarginata*)**. 2019. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.

AGNELLI, J. A.; SCHEIDE, C.; MORENO, A; CASARIN, S.A. Desenvolvimento de produtos pecuários a partir do reaproveitamento de resíduos industriais e fibras vegetais. **Sistemas & Gestão**, v. 11, n. 2, p. 161–74. 2016.

ALIAKBARIAN, B. et al. Antioxidant activity and biological evaluation of olive pomace extract. **Natural Product Research**, v. 26, p. 2280-2290, 2012.

ALMEIDA, D. M. **Biofilme de blenda de fécula de batata e celulose bacteriana na conservação de fruta minimamente processada**. 2010. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais) - Universidade Federal do Paraná (UFPR). Curitiba, p. 284. 2010.

ALMEIDA, P. F de. **Aplicação de gelatina obtida de subproduto animal como substituto parcial de gordura em spread de chocolate**. 2016. Tese (Doutorado em Tecnologia em Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS - AACC. **Approved Methods**. 10. ed. St. Paul: AACC, 2000.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). **Standart Teste Methods of Water Vapor Transmission of Materials (E 96- 95)**. Philadelphia, 1990.

ASTM. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Test Method

for Thickness Measurement of Flexible Packaging Material – F2251 – 13. **Annual book of ASTM**. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, 2013.

AMPESSAN, G. A; GIAROLA, D. A. Estudo das propriedades mecânicas de filmes de proteína de soro de leite modificados com óleo de coco. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 2, 2016.

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Disponível em:  
<<http://www.anp.gov.br/wwwanp/dados-estatisticos>> Acesso em: 30 de novembro de 2021.

ANTUNES et al. Effect of glycerol on the mechanical properties of films the based on chitosan. **Revista Desafios**. v. 6, especial, 2019.

ALBERTOS, I., AVENA-BUSTILLOS, R.J., MARTÍN-DIANA, A. B., W.-X. DU, A.B, RICO, D., MCHUGH, T.H. Antimicrobial Olive Leaf Gelatin films for enhancing the quality of cold-smoked Salmon. **Food Packag. and Shelf Life**. 13, p.49–55, 2017.

ALVES, J.M.N. Revestimento comestível a base carragena e extrato de curcuma longa em ricutas. **Brazilian Journal of Development**. v.5, n.8, 2017.

ALVES, J. S. **Elaboração e caracterização de filmes finos de amido de milho e parafina**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras. Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Lavras, 2009.

ALVES, K. S; SILVA, I. G. M; BALABAN, R. Preparação de derivados de quitosana por alquilação redutiva e o efeito na solubilidade e viscosidade dos derivados. **9º Congresso brasileiro de biopolímeros**, 2007.

ARENAS, A. M. Z. **Filme biodegradável à base de fécula de mandioca com potencial indicador de mudança de Ph**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ASSIS, A. S. **Produção e caracterização do biofilme de quitosana como envoltório protetor em morangos**. 2009. Tese (Doutorado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco. Programa de Pós-graduação em Nutrição, Recife, 2009.

ASSIS, O. B. G. e BRITTO, D. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: Fundamentos e aplicações. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 2, 2014.

AZEVEDO, V.V.C; CHAVES, S. A; BEZERRA, D.C; FOOK, L. M .V; COSTA, A. C. F. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2.3, p.27-34, 2007.

BATISTA, J. A. **Desenvolvimento, caracterização e aplicações de biofilmes a base de pectina, gelatina e ácidos graxos em bananas e sementes de brócolos**. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, p 137. 2004.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K; LIMA, D. P de. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Quím. Nova**, v.34, n. 2, 2011.

- BERTAN, L. C. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes ativos à base de polímeros de fontes renováveis e sua aplicação no acondicionamento de pães de forma.** 2008. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, p 188. 2008.
- BIERHALZ, A. C. K; KIECKBUSH, T. G. Caracterização de biofilmes de pectina reticulados com íons cálcio: efeito da concentração de plastificante. **Anais do 10º congresso brasileiro de biopolímeros**, Foz do Iguaçu, PR, outubro de 2009.
- BOEIRA et al. Antioxidant and antimicrobial effect of an innovative active film containing corn stigma residue extract for refrigerator meat conservation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 9, 2021.
- BÖHMER, B. W. **Potencial antimicrobiano e antitumoral de compostos fenólicos extraídos do bagaço oriundo da obtenção de azeite de oliva (*Olea europaea L.*).** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.
- BRANDALISE, E. B. **Obtenção e caracterização de filmes biodegradáveis de gelatina recuperada de resíduo do couro curtido ao cromo (iii) com tratamento enzimático.** 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias – RS, 2017.
- BRANDEL, G. T., DA PENHA, J. L. J., SARI, L. P., HACKENHAAR, M. L. Grau de importância na compra de produtos alimentícios em relação à qualidade, sabor, preço, marca e embalagem em relação à qualidade, sabor, preço, marca e embalagem. **Mostra de Trabalhos do Curso de Nutrição do Univag**, v. 5, 2019.
- BUENO, C. M. M. **Extração e caracterização de gelatina de pele de tilápia e aplicação como agente encapsulante de óleo de salmão em micropartículas obtidas por coacervação complexa.** Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- BRITO, R. F. **Valorização Integrada de Resíduos e Subprodutos da Extração do Azeite: Extração e Caracterização de Compostos Bioativos do Bagaço de Azeitona.** 2016. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) – Universidade do Algarve, Faro, 2016.
- CAMACHO, A. P. M et al. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v.82, p. 305-307, 2010.
- CANELLA, K. M. N de C; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. **Quím. Nova**, vol. 24, n. 1, 13-17, 2001.
- CAZON, P., & VAZQUEZ, M. Applications of chitosan as food packaging materials. In G. Crini, & E. Lichtfouse. **Sustainable agriculture reviews 36: Chitin and chitosan: Applications in food, agriculture, pharmacy, medicine and wastewater treatment.** (pp.81– 123).



CASARIEGO, A.; SOUSA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; CRUS, L.; DÍAZ, R.; VICENTE, A. A.; Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1895-1902, 2009.

CARISSIMI, M. **Desenvolvimento e aplicação de filmes biodegradáveis a partir de amido de mandioca e microalga verde**. 2017. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2017.

CHICK, J.; HERNANDEZ, R. J. Physical, thermal, and barrier characterization of casein-wax- based edible films. **Journal of food science**, v. 67, n. 3, p. 1073-1079, 2002.

CRIZEL, T. M. et al. Active food packaging prepared with chitosan and olive pomace. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 139-150, 2018.

COSTA, M.; DOS SANTOS PEREIRA, P.; SILVEIRA DA ROSA, G.; MOTTA DE MOURA, C. Avaliação do efeito do ph na extração de compostos ativos do bagaço da oliveira. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 11, n. 2, 30 mar. 2020.

COSTA, M.; SILVEIRA DA ROSA, G. Compostos fenólicos proveniente do bagaço de oliveira (*olea europaea* l.) para aplicação como aditivo natural em biofilme ativo. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 12, n. 2, 4 dez. 2020.

DAL PRÁ, V., DOLWITSCH, C.B., LIMA, F.O., CARVALHO, C.A., VIANA, C., NASCIMENTO, P.C., ROSA, M.B. (2015) Antioxidant Activity of Ultrasound-Treated Cabbage. **Food Technology and Biotechnology**, v.53, n. 1, p. 102–109.

DANTAS, E.M et al. Caracterização e avaliação das propriedades antioxidantes de filmes biodegradáveis incorporados com polpas de frutas tropicais. **Ciência Rural**, v.45, n.1, p.142-148, 2015.

DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P.P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, v. 281, n. 1, p. 225-231, 2005.

DIAS, A. B. **Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis obtidos de amido e de farinha de arroz**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2008.

DIFONZO, G.D. et al. Functional compounds from olive pomace to obtain high-added value foods – review. **Journal of the Science and Agriculture**, v.101, n.1, p. 16-26, 2020.

DE ARAÚJO, V. R.; SHIRAI, M. A. Aplicação de revestimento comestível de quitosana em Brócolis minimamente processado. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 34, n. 2, 2017.

DINIZ, K. S. N; LEAL, R. G; BRAGA, C. R. C; SILVA, S. M. L. Estudo das propriedades morfológicas, térmicas e mecânicas de biofilmes de gelatina/quitosana/montmorilonita visando aplicação como biomaterial. **12º Congresso Brasileiro de Polímeros (12ºCBPol)**, 2011.

DERMACHE, S. et al. Olive mil wastes: biochemical characterizations and valorization strategies. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1532- 1552, 2013.

DE SÁ, I; JR, W R. Biofilme de gelatina e glicerol com propriedade antibacteriana Biofilm of gelatin and glycerol with antibacterial properties. **Latin American Journal of Energy Research**, v. 6, n. 2, p. 1-11, 2019.

DUARTE, C. S. C. **Extração e encapsulamento de compostos bioativos do bagaço de Azeitona**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

DUARTE, M. C. T.; LEME, C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec Escherichia coli. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 139-143, 2006.

EÇA, K. S. et al. Development of Active Films From Pectin and Fruit Extracts: Light Protection, Antioxidant Capacity, and Compounds Stability. **J Food Sci**, v. 80, n. 11, p. 2389-2396, 2015.

FAI, A. E. C; STAMFORD, T. C. M; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 5, p. 435-351, 2008.

FAKHOURI, F, FONTES, L.C., GONÇALVES, V.M., MILANEZ, C.M., STEEL, C.J., COLLARES-QUEIROZ, F.P. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativo e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 27, p. 369-375, 2007.

FARIAS, M. G; LIMA, R. F. M de; CARVALHO, C. W. P. Efeito do ângulo de contato e atividade de água em filmes de amido com polpa de fruta. **III Simpósio Brasileiro de Pós-Colheita** - SPC 2011.

FERREIRA, A H. **Efeito da adição de surfactantes e do ajuste de pH sobre filmes a base de gelatina, triacetina, ácidos graxos e ceras de carnaúba e de cana-de-açúcar**. 2006. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas (FEA). Campinas, p. 220. 2006.

FLECK, N; OLIVEIRA, W.C; VERAS, F.F; BRANDELLI, A.; SANT'ANNA, V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquosos de bagaços de mirtilo e de uva. **7º Simpósio de Segurança Alimentar**, 27 a 29 de outubro de 2020.

FONTELES, U. V. R. S. **Efeitos da incorporação do extrato da semente do urucum em coberturas ativas à base de quitosana na carne bovina**. 2019. Dissertação (Mestrado em produção animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, 2019.

FREITAS, M.R. **Avaliação do potencial energético dos resíduos sólidos dos lagares do Alentejo**. 2007. Dissertação (Mestrado em olivicultura, azeite e azeitona de mesa) – Universidade Técnica de Lisboa, Liboa, 2007.

- FRIEDMAN, M; PHILIP, H. R.; LEVIN, C. E. Bactericidal Activities of Health-Promoting, Food-Derived Powders Against the Foodborne Pathogens *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, v.78 p. 270-275 2013.
- GALANAKIS, M. A. Olive fruit dietary fiber: components, recovery and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v.22, p. 175-184, 2011.
- GALINDO, V. M et al. Atividade antimicrobiana e antioxidante de filmes comestíveis de gelatina e quitosana adicionados de óleos essenciais. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 26, p. 1-9, 2019.
- GARCIA-CRUZ, C. H., FOGGETTI, U., SILVA, A. N. D. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.
- GHORPADE, V. M.; GENNADIOS, A.; HANNA, M. A.; WELLER, C. L. Soy protein isolate/poly (ethylene oxide) films. **Cereal Chemistry**, v. 72, n. 6, p. 559-563, 1995.
- GOLDSMITH, C. D; VUONGA, Q. V; STATHOPOULOSB, C. E; ROACHA, P. D; SCARLETTA, C. J. Ultrasound increases the aqueous extraction of phenolic compounds with high antioxidant activity from olive pomace. **LWT**, v. 89, p. 284-290, 2018.
- GÓMEZ-ESTACA, J., DE LACEY, A. L., LÓPEZ-CABALLERO, M. E., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., MONTERO, P. Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food microbiology**, v. 27, n. 7, p. 889-896, 2010.
- GONÇALVES, L. T., MUSSI, L. P., PRATES, L. O., GLÓRIA, L. D. L., AVELAR, A. R. Avaliação da influência de cobertura de alginato na secagem de maçã fuji. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 2, n. 1, p. 1685-1692, 2015.
- GONÇALVES, S. S. ANTUNES, L.B; SILVEIRA, M.F. Efeito do glicerol nas propriedades mecânicas de filmes a base de quitosana. **Revista Desafios**, v. 6, especial, 2019.
- GONTARD, N. et al. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 29, p. 39-50, 1994.
- GONTARD, N. **Films et enrobages comestibles: étude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten**. 1991. Tese (Doctorat Biochimie, Biologie Cellulaire et 190 Moleculaire/Sciences des Aliments), Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, p. 174, 1991.
- GROSSMAN, M. V. E.; MALI, S.; SHIMAZU, A. A. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, PR, v.28, n. 1, p. 79-88, 2007.
- HAHLADAKIS, J.; LACOVIDOU, E. Closing the loop on plastic packaging materials: What is quality and how does it affect their circularity? **Science of the Total Environment**, v. 630, p. 1394-1400, 2018.

HASAN, M; LAI, T. K; GOPAKUMAR, D; JAWAID, M. Micro Crystalline Bamboo Cellulose Based Seaweed Biodegradable Composite Films for Sustainable Packaging Material. **Journal of Polymers and the Environment**, v.27, p.1602–1612, 2019.

INNOCENTINI-MEI, L.H.; MARIANI, P.D.S.C. **Visão Geral sobre Polímeros ou Plásticos Ambientalmente Degradáveis**. Unicamp: Campinas, p. 41, 2005.

JACOBS, V; SOUZA, F. S; HAMM, J. B. S; MANCILHA, F. S. N. Produção e caracterização de biofilmes de amido incorporados com polpa de acerola. **Revista Ibero-americana de Polímeros**, v.21, n.3, 2020.

JÚNIOR, A. F. de A. **Síntese e caracterização de biofilmes à base de alginato de sódio reticulado com poli(acrilamida) catiônica**. 2017. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís – MA, 2017.

JÚNIOR, F. G. B. F. F., SANTOS, M. P., DE MOURA, M. S., DUARTE, L. G., DA COSTA MACEDO, K. B., DA SILVA, M. D. S., DE OLIVEIRA, L. B. T. Uso de embalagem plástica e comestível para conservação de goiaba sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 4, p. 463-473, 2020.

JOHNSTON-BANKS, F. A. Gelatin: Food Gels. **Elsevier Applied Science**, London, v. 26, p. 885-891, 1990.

KROCHTA, J.M; MULDER-JHONSTON, C.D. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, v.51, n.2, p.61-64,1997.

LAFKA, T. L; LAZOU, A. E; SINANOGLU, V. J; LAZOS, E. S. Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 92-98, 2011.

LARANJEIRA, M. C. M; FÁVERE, V. T. de. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quim. Nova**, vol. 32, n. 3, 672-678, 2009.

LEONARDIS, A. de. et al. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. **European Food Research Technology**, v. 226, n. 4, p. 653-659, 2007.

LIMA, R. T. F. M. **Extração da pectina do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) para incorporação em biofilmes**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Francisco Beltrão, p. 46. 2019.

LIN, L. et al. An overview of gelatin derived from aquatic animals: Properties and modification. **Trends in Food Science & Technology**. v. 68, p. 102-112.

LUCENA, C. A. A. D., COSTA, S. C. D., ELEAMEN, G. R. D. A., MENDONÇA, E. A. D. M., OLIVEIRA, E. E. Desenvolvimento de biofilmes à base de xilana e xilana/gelatina para produção de embalagens biodegradáveis. **Polímeros**, v. 27, n. SPE, p. 35-41, 2017.

MACHADO, M. L. Q. **Síntese e caracterização de biofilme à base de quitosana e glicerol**

**para aplicação em embalagens de alimentos.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química) - Universidade federal doPampa, Bagé, 2021.

MALHERBI, N. M. **Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a base de polímeros de fontes renováveis e polpa de guabiroba (Campomanesia xanthocarpa).** Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus de Laranjeiras do Sul, 2015.

MARTUCCI, J. F., RUSECKAITE, R.A. Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. **Polym. Degrad. Stab**, v.94, p.1307-1313, 2009.

MEDEIROS, R. M. A; VILLA, F; SILVA, D. F da; FILHO, L. R. C. Destinação e reaproveitamento de subprodutos da extração olivícola. **Sciencia Agraria**, v. 15, n. 12, abr./jun., p. 100-108, 2016.

MELLO, L. D.; PINHEIRO, M. F. Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 23, n. 4, p. 537-548, 2012.

MENDES, F.L.R; CARVALHO, E.M. de; ABRANTES, J.A.A; NOGUEIRA, J.M. da R. Buscando novos antimicrobianos: avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Eugenia brasiliensis*. **Revista RBAC**, v.52, n. 3, p.228-234 , 2020.

MILLER, C. M. O; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers, Barking**, v. 72, p. 82-87, 2008.

MIRABELLA, N.; CASTELLANI. V.; SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 28-41, 2014.

MONTERREY, E.S; SOBRAL, P. J. do A. Caracterização de propriedades mecânicas e óticas de biofilmes a base de proteínas miofibrilares de tilápia do nilo usando uma metodologia de superfície- resposta. **Food Sci. Technol**, v.19, n.2, 1999.

NASCIMENTO, S. D. do et al. Efeito da adição de argila nas propriedades de biofilme de quitosana Effect of clay addition on the properties of chitosan biofilm. **Revista Verde** (Mossoró – RN), v. 8, n. 1, p. 306-312, 2013.

OLIVEIRA, A. F. de. et al. **Oliveira no Brasil: tecnologias de produção**/Adelson Francisco de Oliveira, editor técnico. - Belo Horizonte: EPAMIG, 2012.

OLIVEIRA, B. S., & NUNES, M. L. Avaliação de quitosana de caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) como biofilme protetor em caju. **Scientia Plena**, v. 7, n. 4, 2011.

OLIVEIRA, L. M.; ALVES, R. M. V.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; PADULA, M.; GARCIA, E.E. C; COLTRO, L. **Ensaio para avaliação de embalagens plásticas flexíveis.** CETEA/ITAL, p. 202, 1996.

OLIVEIRA, T. A., AROUCHA, E. M. M., LEITE, R. H. L., FERREIRA, R. M. A.,

- SANTOS, F. K. G. Conservação pós-colheita de carambola sob refrigeração com recobrimento de biofilme de gelatina e PVC. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 4, p. 59-66, 2015.
- PALMU, PST. **Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo**. Tese (Doutor em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, p. 244. 2003.
- PAULINO, L. G. S et al. Recuperação de compostos bioativos de subprodutos da olivicultura. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v.12, n. 2, 12 de abril de 2020.
- RECOUVREUX, D. D. O. S. **Produção de celulose bacteriana: identificação do Operon bcs e produção de biofilme celulósico por Chromobacterium violaceum**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis, p. 124. 2004.
- QUERIOZ, E. L. Q; SOUZA, S. M. A. Embalagem bioativa de amido de mandioca com adição de extrato de Jamelão (*Syzigium cumini*). **XXI Seminário de Iniciação Científica**, n.2, 2017.
- RIGO, L. N. **Desenvolvimento e caracterização de filmes comestíveis**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguia das Missões (URI). Erechim, p. 130. 2006.
- ROESLER, R., MALTA, L.G., CARRASCO, L.C., HOLANDA, R.B., SOUSA, C.A.S., PASTORE, G.M. Antioxidant activity of native fruits. **Food Science and Technology**, v.27, n.1,p.53-60, 2007. doi:10.1590/S0101-20612007000100010.
- SANCHEZ-GONZALES, L., Physical properties of edible chitosan films containing bergamol essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1318-1325, 2010.
- SGANZERLA, W. G; VEECK, A. P de L. Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis a base de amido de pinhão e pectina cítrica contendo farinha da casca de goiaba serrana (*Acca sellowiana*), 2018. Acesso em <  
<http://docente.ifsc.edu.br/michael.nunes/MaterialDidatico/Analises%20Quimicas/TCC%20II/TCC%202017%201/William%20Sganzerla.pdf>>
- SANTOS, B dos. **Biodegradabilidade de filmes baseados em biopolímero e óleo essencial de erva-doce**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira – SP, 2020.
- SANTOS et al. Avaliação e caracterização de biofilme comestível de carboximetilcelulose contendo nanopartículas de quitosana e Cúrcuma longa. **Matéria (Rio J.)**, v. 26, n. 01, 2021.
- SARMA, S.J. et al. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.37, p. 6473-6490, 2012.
- SCAPIM, M. R. **Produção, caracterização, aplicação e biodegradabilidade de filmes de**

**blendas de amido e poli (butileno adipato co-tereftalato) produzidos por extrusão.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Londrina, PR, 2009.

SHIKU, Y; HAMAGUCHI, P. Y; TANAKA, M. Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins. **Fisheries Science**, v.69, n.2, p. 1026-1032, 2003.

SIQUEIRA, I.; MACIEL PIRES, K.; MASSUQUINI DA SILVEIRA, C.; SOARES DIAS, C.; MOTTA DE MOURA, C. Biofilmes de gelatina adicionado de óleo de resíduo da olivicultura: pva e cor. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 11, n. 2, 28 ago. 2020.

SIQUEIRA, R. A. **Características tecnológicas e aplicabilidade de embalagens biodegradáveis de pectina do mesocarpo do pequi na conservação de cenouras minimamente processadas.** 2019. Dissertação (mestre em Tecnologia de alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde (IF GOIANO). Rio Verde. p.106, 2019.

SILVA, E. M da. **Produção e caracterização de filmes biodegradáveis de amido e pinhão. Trabalho de conclusão de curso em engenharia química.** 2011. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Engenharia Química)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SILVA, J. F. M da; PRADO, G; MADEIRA, J. E. G. C; OLIVEIRA, M. S; FARACO, A. A. G; MALTA, C. M; NICOLI, J. R; PIMENTA, R. S. Utilização de filme de quitosana para o controle de aflatoxinas em amendoim. *Tecnologia pós-colheita*. **Bragantia**, v. 74, n. 4, 2015.

SILVA, L. H. **Secagem do bagaço de azeitona (olea europaea l.) para obtenção e caracterização de farinha.** (Trabalho de conclusão de curso para obtenção de título de Bacharel em Engenharia dos Alimentos) – Universidade Federal do Pampa, Bagé, 2021.

SILVA, M. G et al. Caracterização de filmes à base de quitosana. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ, XI**, Campinas – São Paulo, 2015.

SILVA, W. B., LIMA SOUSA, C. L., ARAUJO, C. S., DO NASCIMENTO, V. H. A., & DE FÁTIMA HENRIQUES LOURENÇO, L. Propriedades tecnológicas e antimicrobiana de biofilmes de proteínas de peixe com óleo essencial de cravo. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences/Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 14, n. 2, 2019.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., & LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, p. 152–178. doi: 10.1016/s0076-6879(99)99017-1

SOARES, B. M. **Pré-tratamentos aquosos do bagaço e caroço de azeitona para obtenção de compostos de valor acrescentado.** 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Universidade de Lisboa, Portugal, 2019.

SOQUETTA, M. B. **Metodologias não convencionais na extração de compostos bioativos de casca de bergamota.** 2019. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2019.

SPERONI, C. S. et al. Micronization and granulometric fractionation improve polyphenol content and antioxidant capacity of olive pomace. **Industrial Crops and Products**, v.137, p. 347-355, 2019.

SOBRAL, P. J. A. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. **Ciência & Engenharia**. Uberlândia, v.8, n. 1, p. 60-67, 1999.

SUÁREZ, M. et al. Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1463-1472, 2009.

TOMÁS, M. B. B. **Otimização dos processos de controlo laboratorial e análise de fatores que influenciam a extração e qualidade do óleo de bagaço de azeitona**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica) – Universidade Nova de Lisboa. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, 2018.

THARAHATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science's Technology**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 71- 78, 2003.

VASCONCELLOS, E. A.; DIAS, C.S.; RODRIGUES, R.S; CREXI, V.T. Óleo do bagaço de azeitona: Influência do tempo e da temperatura de extração nos compostos fenólicos e na atividade antioxidante. **7º Simpósio de Segurança Alimentar**, 27 a 29 de outubro de 2020.

VICENTINI, N. M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita**. 2003. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP – Campus de Botucatu, Botucatu, São Paulo, 2003.

VICINIESCKI, R. P. **Avaliação da atividade antioxidante dpph e quelante da farinha e extrato do pseudofruto de hovenia dulcis thunberg obtido por ultrassom**. 2020. (Trabalho final da disciplina de Conclusão de Curso II, do Curso de Engenharia Química) - Universidade do Vale do Taquari – UNIVATES, Lajeado – RS, 2020.

VOGLER, E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Adv. Colloid Interface Science**, 74, p. 69, 1998.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, Oxford, v.64, n.4, p.555-559, 1999.

ZHONG, Y.; SONG, X.; LI, Y. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as a functions of acid solvent types. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 335-342, 2011.